

DER EINFLUSS VON L-THYROXIN UND THIOHARNSTOFF
AUF DIE DNA-SYNTHESE BEIM HÜHNEREMBRYO

JOHANN-PETER BAST

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554818_0117

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Der Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff
auf die DNA-Synthese beim Hühnerembryo

Inaugural - Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Johann-Peter Bast
aus
Siegen-Eiserfeld

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. J. Wittmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	
2.1.	Beeinflussung der embryonalen Entwicklung durch L-Thyroxin und Thioharnstoff	2
2.2.	DNA-Synthese und embryonale Entwicklung	9
2.3.	Entwicklung der Organe	
2.3.1.	Entwicklung der Leber	12
2.3.2.	Entwicklung der Lunge	13
2.3.3.	Entwicklung der Niere	14
2.3.4.	Entwicklung der Thyreoidea	17
2.4.	Zielsetzung	20
3.	Eigene Untersuchungen	
3.1.	Material	
3.1.1.	Untersuchungsmaterial	21
3.1.2.	Reagentien	21
3.1.3.	Geräte	22
3.1.4.	Herstellung und Konzentration der verwendeten Lösungen	22
3.2.	Methode	
3.2.1.	Applikation der Substanzen	24
3.2.2.	Entnahme der Organe	26
3.2.3.	Aufarbeitung der Organe	
3.2.3.1.	Isolierung der Zellkerne	26
3.2.3.2.	DNA-Bestimmung mit Diphenylamin nach BURTON (1956)	27

3.2.3.3.	Radioaktivitätsmessung markierter DNA	29
3.3.	Kontrolle der Anflutung im gesamten Organ	30
3.4.	Bestimmung des L-Thyroxin-Blutspiegels	32
3.5.	Statistische Berechnung	32
4.	Ergebnisse	
4.1.	Untersuchungen vom 17. - 20. Tag der Inkubation	
4.1.1.	Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den Thymidin-Einbau in die DNA der Leber, Lunge und Niere	33
4.2.	Untersuchungen vom 10. - 16. Tag der Inkubation	
4.2.1.	Allgemeine Untersuchungen	
4.2.1.1.	Beeinflussung des Schlupfgeschehens	36
4.2.2.	Spezielle Untersuchungen	
4.2.2.1.	Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den Thymidin-Einbau in die DNA der untersuchten Organe	39
4.2.2.2.	Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den DNA-Gehalt der Organe	49
4.2.2.3.	Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf das Gewicht der Organe	51
4.2.2.4.	Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den L-Thyroxin-Blutspiegel	52
5.	Diskussion	53
6.	Zusammenfassung	60
7.	Literaturverzeichnis	64

Einleitung

Der Geflügelembryo wird seit langem für embryologische Studien vielfältig eingesetzt. Auf Grund der besonderen Gegebenheiten erweist er sich für Manipulationen am embryologischen Wachs-
tum auch als besonders geeignet. In diesem Zusammenhang wurden sehr oft die Schilddrüsenhormone eingesetzt, die beim Vogelembryo einen beschleunigten Schlupf auslösen. Ein Großteil dieser Untersuchungen befaßte sich mit den Auswirkungen in der Endphase der Embryogenese. Bis heute konnte der molekular-biologische Mechanismus, der zum vorzeitigen Schlupf führt, nicht geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Versuch unternommen, die Auswirkungen von L-Thyroxin und Thioharnstoff, einem Thyreostatikum, in der Mitte der Embryogenese mit denen im Endabschnitt der pränatalen Phase zu vergleichen. Dabei wurde die Wirkung von L-Thyroxin und Thioharnstoff anhand des Thymidin-Einbaus in die DNA überprüft.

2. Literatur

2.1. Beeinflussung der embryonalen Entwicklung durch L-Thyroxin und Thioharnstoff

Daß Schilddrüsenhormone in das Wachstum und die Entwicklung eingreifen, kann schon seit langem als wissenschaftlich erwiesen angesehen werden. Eindeutig manifestiert sich eine derartige Funktion der Schilddrüse in der neonatalen Phase: Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen führt zu einer ausgeprägten Verzögerung im Wachstum und der Reifung fast aller Organe. Ebenso deutlich ist unter diesen Bedingungen die zunehmend negative N-Bilanz, sowie die Abnahme in der Hydroxyprolin-Ausscheidung, die als Kriterium des Kollagenstoffwechsels anzusehen ist (SMILEY und ZIFF 1964).

Dem gegenüber ist die Funktion der Schilddrüsenhormone in der pränatalen Phase beim Säuger und Mensch umstritten. Eine experimentell ausgelöste Hypothyreose führt bei der Ratte und beim Kaninchen zu keiner signifikanten Wachstumsdepression (GELESO et al. 1968). Auch bei Kretins weicht das Geburtsgewicht und die Geburtsgröße nicht von den üblichen Durchschnittswerten ab. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß beim Menschen vor der 10. fetalen Lebenswoche weder Jod gebunden, noch Jod-Thyronin gebildet wird (SHEPARD 1967). In Einklang damit steht, daß sich bis zu diesem Zeitpunkt im fetalen Blut keine Schilddrüsenhormone nachweisen lassen (GREENBERG et al. 1970). Da die Plazenta für Schilddrüsenhormone kaum permeabel ist, legen diese Befunde die Vermutung nahe, daß sich die frühe embryonale Phase beim Menschen und wahr-

scheinlich auch beim Säuger ohne die Einwirkung der Schilddrüsenhormone vollzieht. Schließlich gibt es keine deutlichen Hinweise, daß Schilddrüsenhormone eine vorzeitige Geburt beim Säuger auslösen.

Demgegenüber ist bei Nicht-Säugern ein positiver Einfluß der Schilddrüsenhormone auf die Entwicklung seit langem bekannt. So kann durch die Applikation von L-Thyroxin bei Insekten und Amphibien die Metamorphose beschleunigt und beim Vogelembryo die Bebrütungszeit verkürzt werden. Dieser positive Einfluß auf die Entwicklung des Hühnerembryos wurde von OPPENHEIM (1973), SCHMIDT (1986), WEIß (1979) und WITTMANN et al. (1984) durch eine Applikation am 17. Tag der Inkubation belegt. Eine Verkürzung der Bebrütungszeit um 1 Tag war die Regel. Auch BALABAN und HILL (1971) beschreiben einen um 18 Stunden vorverlegten Schlupf durch die Applikation von 0,02 mg L-Thyroxin am 17. Tag. BEYER (1962) war es sogar möglich durch eine Applikation kurz vor Beginn der Bebrütung eine um 1 Tag verkürzte Bebrütungszeit aufzuzeigen, obwohl die biologische Halbwertszeit von L-Thyroxin nach HENNINGER und NEWCOMER (1964) nur 8,3 Stunden beträgt. BEYER (1962) führte keine Untersuchungen durch, ab welchem Zeitpunkt das Hormon wirksam war. Möglicherweise wurde das in das Ei applizierte L-Thyroxin erst sehr spät vom Embryo aufgenommen.

Umgekehrt konnte durch die thyreostatische Wirkung des Thioharnstoffs die embryonale Entwick-

lung verlangsamt werden. Als ein markantes Anzeichen der beeinflussten Entwicklung kann der verzögerte Schlupfzeitpunkt betrachtet werden. Es zeigte sich aber, daß die Dauer der Schlupfverzögerung durch den Applikationszeitpunkt bestimmt wird. GROSSOWICZ (1946) verzögerte durch die Applikation von Thioharnstoff in einer Menge von 1 mg/Ei am 17. Tag den Schlupf um 1 Tag. Durch die Applikation der gleichen Menge am 10. Tag wurde die Verzögerung auf 3 Tage ausgedehnt. Auch BALABAN und HILL (1971) belegen die Bedeutung des Applikationszeitpunktes. Embryonen schlüpften 20 Stunden nach den Kontrollen, wenn sie am 17. Tag mit 2 mg behandelt wurden. Wurde die Behandlung am 16. Tag mit der gleichen Dosis durchgeführt, so kamen sie nicht zum Schlupf, überlebten aber zum Teil bis zum 24. Tag im Ei. Auch SCHMIDT (1986), WEIß (1979) und WITTMANN et al. (1984) war es möglich, durch die am 17. Tag vorgenommene Applikation den Schlupf um 1 Tag zu verzögern. Weitere Untersuchungen ergaben sogar eine gewisse konzentrationsabhängige Wirkung auf die Dauer der Schlupfverzögerung. Wie GROSSOWICZ (1946) zeigte, verlängert sich bei Steigerung der Dosis von 1 auf 2 mg - in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt - die Inkubationsdauer von 3 bis maximal 7 Tage. Mit 3 mg wurde die Bebrütungsdauer sogar auf 30 Tage ausgedehnt. Auch FREEMAN (1964 a) konnte die konzentrationsabhängige Schlupfverzögerung durch die Applikation am 18,5 - 19. Tag belegen. Durch 2 mg Thioharnstoff wurde der Schlupf um 10,7 und durch 4 mg um 17,3 Stunden verschoben. BALABAN und HILL (1971) war es mög-

lich, die durch Thioharnstoff erzielte Schlupfverzögerung von 20 Stunden durch die Gabe von 0,02 mg L-Thyroxin wieder aufzuheben. Ein vergleichbares Ergebnis erzielte FREEMAN (1964 a), wenn Thioharnstoff und L-Thyroxin gleichzeitig appliziert wurden.

Im Zusammenhang mit dem Effekt auf den Schlupf wurde auch die Resorption des Dottersackes verfolgt. Nach den Beobachtungen von GROSSOWICZ (1946) verhindert die Gabe von 3 mg Thioharnstoff dessen Resorption. Dies konnte auch von WEIS (1979) bestätigt werden. Umgekehrt zeigte dieser eine beschleunigte Resorption unter dem Einfluß von L-Thyroxin. Außerdem belegte er, daß die Resorption des Dottersackes parallel zum Einbau von den aus dem Dotter stammenden Lipiden in die Leber einhergeht. Unter dem Einfluß von L-Thyroxin war die Lipidanreicherung beschleunigt und unter Thioharnstoff verzögert. Es sei weiterhin vermerkt, daß auch BALABAN und HILL (1971) in ihren Versuchen den Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf die Resorption des Dotters beobachteten. Dies spricht dafür, daß man davon ausgehen kann, daß die Resorption des Dottersackes auf das Schlupfgeschehen abgestimmt ist.

Ein interessantes Phänomen ist die noch pränatal einsetzende Lungenatmung beim Vogel. Sie wird durch die Ausbildung der Luftkammer im Verlauf der Bebrütung ermöglicht. Auffallend dabei ist, daß sich die Ausbildung der Lungenatmung beim Vogel im Gegensatz zum Säugetier über einen relativ langen Zeitraum erstreckt. Beim Hühnerembryo setzt sie um



den 19./20. Tag ein. Werden die Embryonen mit L-Thyroxin behandelt, so führt dies zu einer vorzeitigen Auslösung der Lungenatmung (OPPENHEIM 1973). Dieser Befund wurde auch von WITTMANN et al. (1984) bestätigt. Eine entgegengesetzte Wirkung auf die Lungenatmung erfolgte durch die Gabe von Thioharnstoff, wobei durch die Verabreichung einer höheren Dosis die Lungenatmung sogar völlig unterdrückt werden konnte (WITTMANN et al. 1984).

WITTMANN et al. (1984) haben parallel zur Lungenatmung auch das Motilitätsverhalten registriert und konnten dabei zeigen, daß dem Anstieg in der Motilität, welche zum Schlupf führt, stets die Einleitung der Lungenatmung voraus geht. Wurde andererseits die Lungenatmung durch hohe Gaben von Thioharnstoff unterdrückt, so blieb auch der Motilitätsanstieg aus, der charakteristisch für die Schlupfauslösung ist. Aus diesem Befund schließen die Autoren, daß die noch pränatal einsetzende Lungenatmung als eine Voraussetzung für die Einleitung des Schlupfes anzusehen ist. Die durch die Lungenatmung in der Luftkammer allmählich ausgebildete Hypoxie stellt offensichtlich den Stimulus für das Anpicken der Eischale dar.

Der molekulare Mechanismus, der der Einwirkung des L-Thyroxin und des Thioharnstoff zugrunde liegt, wurde von SCHMIDT (1986) eingehender untersucht. Nach seinen Befunden kommt es in der Zeit der beginnenden Lungenatmung zu einem deutlichen Anstieg der Kallikrein-Aktivität und zu einem Plateau im

Anstieg des Angiotensin-Converting-Enzym. Da das Kallikrein die Bildung von Bradykinin und das Angiotensin-Converting-Enzym den Abbau katalysiert, ist unter den oben genannten Umständen mit einer vermehrten Bradykinin-Bildung zu rechnen, die den Gefäßwiderstand der Lunge erniedrigt und dadurch den Einstrom des Blutes in die Lunge begünstigt. Wie den Befunden von SCHMIDT (1986) zu entnehmen ist, werden unter dem Einfluß von L-Thyroxin die oben genannten Umstellungen in der Aktivität des Kallikrein und Angiotensin-Converting-Enzym vorzeitig erreicht und nach Applikation von Thioharnstoff verspätet. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die Schilddrüsenhormone über die Regulierung der Bradykinin-Bildung in die Auslösung der Lungenatmung beim Vogel eingreifen.

Im Zusammenhang mit dem Schlupfgeschehen wurde auch der Ausbildung des Nackenmuskels (Schlupfmuskel) eine Bedeutung beigemessen. Dieser Muskel, der vom Embryo beim Durchbrechen der Eischale vorwiegend eingesetzt wird, vergrößert sich um etwa das 5 fache gegen den Schlupf zu. BRANDSTETTER et al. (1962) beobachteten eine deutlich geringere Zunahme unter dem Einfluß von Thioharnstoff, die sich jedoch nach der Gabe von L-Thyroxin nicht mehr einstellte.

Eine Reihe von Autoren verfolgte die Wirkung von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf die embryonale Entwicklung anhand der Gewichtveränderungen. Die dabei gemachten Beobachtungen sind zum Teil sehr widersprüchlich. BEYER (1962) konnte nach Gaben von L-Thyroxin eine erhöhte Gewichtszunahme registrieren,

die von ROMIJN et al. (1952) nicht beobachtet werden konnte. Umgekehrt stellte sich nach Applikation von Thioharnstoff eine verminderte Wachstumsrate ein (RAHEJA und LINSCHEEER 1979). Das Ausmaß der Wachstumsverzögerung ist offensichtlich ganz entscheidend vom Zeitpunkt der Applikation des Thioharnstoff abhängig. Am größten war der Effekt, wenn die Substanz in einem Zeitraum vom 0. - 6. Tag der Inkubation verabreicht wurde (ROMANOFF und LAUFER 1956). Außerdem sei vermerkt, daß neben der Wachstumsrate der einzelnen Organe auch der Stoffwechsel sich unter dem Einfluß von L-Thyroxin oder Thioharnstoff charakteristisch verändert. So löst L-Thyroxin in der Leber einen vorzeitigen Abbau von Glykogen und Adenosintriphosphat (ATP) aus, der unter dem Einfluß von Thioharnstoff verlangsamt wird (WEIß 1979). Schließlich fällt nach Applikation von Thioharnstoff eine ausgeprägte Hypertrophie der Schilddrüse auf. Diese ist im Gegensatz zu dem oben genannten Einfluß auf die Wachstumsrate zwischen dem 9. bis 12. Tag besonders ausgeprägt (ROMANOFF und LAUFER 1956). Die im Gegensatz zur Wachstumsrate erst später auslösbare ausgeprägte Hypertrophie der Schilddrüse ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die endokrine Funktion erst zu diesem Zeitpunkt verstärkt einsetzt.

2.2. DNA-Synthese und embryonale Entwicklung

Die embryonale Entwicklung und Differenzierung unterliegt einem komplizierten Kontrollmechanismus, dessen zentraler Angriffspunkt der Nukleinsäurestoffwechsel ist. Es ist daher verständlich, daß sich das wissenschaftliche Interesse schon lange auf den embryologischen Nukleinsäurestoffwechsel konzentriert.

So beschäftigte sich EMANUELLSON (1958) mit dem DNA- und RNA-Stoffwechsel in der frühen embryonalen Phase des Hühnchens. Dabei konnte er zeigen, daß die Ruhephase, die nach der Eiablage existiert, von einer ersten Phase der Zellmultiplikation abgelöst wird, die ihr Maximum nach annähernd 10 Stunden erreicht. Daran schließt sich eine Phase, in der Differenzierungsprozesse in embryologischen Arealen vorherrschen, an. Dieser Differenzierungsphase folgen 2 weitere Phasen der Zellmultiplikation von annähernd 10 - 12 Stunden. Insgesamt geht die Entwicklung innerhalb der ersten 25 Stunden mit einem markanten Anstieg der DNA-Bildung des Blastoderms einher. Im Intervall zwischen den einzelnen Phasen sieht EMANUELLSON (1958) eine Bestätigung der früher von ihm bestimmten Zeit für Mitose und Interphase von 10 - 12 Stunden. Offensichtlich vollzieht sich die frühe embryonale Entwicklung in Perioden der Zellmultiplikation und Ausdifferenzierung.

Im Gegensatz zu EMANUELLSON (1958) haben CALDARERA und MORUZZI (1965) den DNA- und RNA-Gehalt des Gesamt-Embryos im Verlauf der gesamten Entwicklung des

Hühnerembryos verfolgt. Sie konnten dabei zeigen, daß sich sowohl im r-RNA- und Kern-RNA-Gehalt, als auch im Kern-DNA-Gehalt am 4. und 14. Tag der Bebrütung ein Maximum ausbildet. Demgegenüber erhöhte sich die mitochondriale RNA bis zum 6. Tag der Inkubation, um bis zum Schlupf hin wieder langsam abzufallen. Bei den Befunden von CALDARERA und MORUZZI (1965) fällt auf, daß der Verlauf der DNA- und RNA-Konzentration parallel zu dem der Konzentration der entsprechenden Polyamine ist.

Obgleich man davon ausgehen kann, daß der Vorgang der embryonalen Entwicklung einer genetisch vorgegebenen Kontrolle unterliegt, gibt es zahlreiche Möglichkeiten in den Verlauf der Entwicklung einzugreifen. Dies wird besonders auffällig bei Eingriffen mit pathologischen Auswirkungen, wie sie durch die Applikation von chemischen Substanzen oder durch die Veränderung der Inkubationsbedingungen zu beobachten sind. Hierzu sind schließlich auch die Untersuchungen mit Schilddrüsenhormonen und Thyreostatika zu zählen, die oben bereits dargestellt wurden. Bei dem Einsatz von Schilddrüsenhormonen hat man zwei wesentliche Wirkungen zu unterscheiden: Einmal steigern sie, in höherer Konzentration verabreicht, die Sauerstoffaufnahme aller stoffwechselaktiven Organe, welcher in erster Linie eine Aktivierung der Atmungskette zugrunde liegt. Demgegenüber haben geringe Mengen an Schilddrüsenhormonen einen anabolen Effekt zur Folge, das heißt, sie beschleunigen die Proteinsynthese. Diese

steht auch bei der Einwirkung auf die Entwicklung im Vordergrund. Für die Wirkung zeichnet sich mehr und mehr ein Mechanismus ab, der dem der Steroidhormone ähnlich ist: Die Schilddrüsenhormone reagieren mit einem zytosolischen Rezeptorprotein und gelangen als " Hormon-Rezeptor-Komplex " in den Zellkern, wo sie spezifisch auf den Nukleinsäurestoffwechsel einwirken (FISHER et al. 1982).

Die beschleunigende Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die Entwicklung und Differenzierung läßt sich dann auch in einem gesteigerten Nukleinsäurestoffwechsel nachweisen. So führte die exogene Behandlung mit L-Thyroxin bei der Kaulquappe zu einem vermehrten Einbau an Thymidin in die DNA, einer Stabilisierung der RNA und einem vermehrten Einbau an Leucin in die Proteine in Organen, welche wie die Lunge im Verlauf der Metamorphose ausgebildet werden (SMITH-GILL und CAVER 1981).

2.3. Entwicklung der Organe

2.3.1. Entwicklung der Leber

Die primäre Leberanlage, die von auswanderndem Endoderm gebildet wird, kann ab dem Ende des 2. Bruttages lokalisiert werden. Einige Stunden später können sekundäre Anlagen in Form von Divertikeln bestimmt werden (ROMANOFF 1960). Die höchste Wachstumsrate zeigt die Leber an den ersten Entwicklungstagen. Von DUMM und LEVY (1949) konnte eine Zunahme sowohl im Trockengewicht, als auch im Naßgewicht vom 4. bis 8. Tag belegt werden. Nach dem 11. Tag verlangsamt sich die Wachstumsrate und auch das Verhältnis Lebergewicht/Körpergewicht nimmt ab (DUMM und LEVY 1949). Lipid-Kügelchen können nach dem 6. Tag in den Parenchymzellen beobachtet werden. Bis zum Ende der Bebrütung nehmen diese an Zahl und Größe zu (HANES 1912). Diese Fettröpfchen akkumulieren in den Zellen zwischen dem Kern und den Gallenkanälchen (KIRKMAN 1931). Zuerst bestehen die Tröpfchen aus Lipiden und Phosphatiden (HANES 1912). Zwischen dem 11. und 14. Tag werden einige der Kügelchen anisotroph (DALTON 1937 b, HANES 1912). Am 17. Tag sind alle anisotroph und bestehen aus Cholesterin, Cholesterinester und einer Mischung aus Cholesterin und Fettsäuren (HANES 1912). Simultan zur Cholesterineinlagerung steigt der prozentuale Fettanteil der Leber steil an (DUMM und LEVY 1949). Zur selben Zeit ändert die Leber ihre Farbe durch die Einlagerung von gelben Pigmenten und Lipiden, die aus dem Dottersack stammen (HANES 1912). Die erste Gallensekre-

ekretion wird von KUO (1932 a) auf den 7. - 9. Tag der Inkubation datiert. Die Glykogenspeicherung der Leber beginnt mit dem 7. Tag der Bebrütung. Die Menge des eingelagerten Glykogens steigt bis zum 9. Tag geradlinig an und fällt zum 12. Tag wieder ab, um ab dem 18. Tag wieder anzusteigen. Während der Anfangsperiode der Einlagerung ist das Glykogenvorkommen auf Zellen in der Nähe von großen Venen konzentriert. Ab dem 14. Tag ist das Glykogen über die ganze Leber verteilt (DALTON 1937 b). Peptidase-Aktivitäten können schon ab dem 5. Tag der Bebrütung bestimmt werden und nehmen bis zum 8. Tag um ein 16 faches, bis zum 14. Tag um ein 20 faches zu (DUMM und LEVY 1949).

2.3.2. Die Entwicklung der Lunge

Die Anlage der Lunge ist von Anfang an paarig ausgebildet und kann am 3. Tag der Inkubation zum ersten Mal lokalisiert werden (LOCY und LARSELL 1961 a, 1961 b). Das Respirationssystem entwickelt sich von 2 verschiedenen Stellen ausgehend: Larynx und Trachea bilden sich aus der laryngotrachealen Rinne, aus 2 endodermalen Divertikeln des Verdauungstraktes entstehen die Bronchien und die Luftsäcke der Lunge (FEDDE 1976, FREEMAN und VINCE 1974, ROMANOFF 1960). Im Gegensatz zum Säugetier, bei dem die Lungenatmung erst während der Geburt durch das Zerreißen der Nabelschnur ausgelöst wird, setzt beim Vogelembryo die Lungenatmung schon innerhalb des Eies ein, was bereits oben angeführt wurde. Die Respiration beginnt als ein sich langsam steigender Prozess ca. 24 Stunden vor

dem Schlupf (ROMIJN und ROSS 1938). Sie setzt in dem Moment ein, wenn der Schnabel in die Luftkammer eindringt (ROMIJN 1948). Die Ausdifferenzierung der Luftkapillaren, die den Lungenalveolen des Säugers entsprechen, vollzieht sich erst im letzten Viertel der Inkubation. In dieser Phase kommt es auch zur Ausbildung des Surfactand. Bemerkenswert bei der Vogellunge ist, daß das Einsetzen der Atmung nicht mit einer Entfaltung der Luftkapillaren einhergeht. Der entfaltete Status der Luftkapillaren wird durch die Aufhängung der Lunge und die Luftsäcke garantiert.

2.3.3. Die Entwicklung der Niere

Die sich differenzierende Vorniere (Pronephros) hat ihren Ursprung im intermediären, mesodermalen Gewebe. Die ersten Tubuli treten am 2. Tag der Bebrütung (33. - 34. Stunde) als paarige Verdickungen auf (FREEMAN und VINCE 1974, ROMANOFF 1960). Die Degeneration der Vorniere ist am 4. Tag abgeschlossen. (FREEMAN und VINCE 1974). Die Glomerula der Vorniere beginnen am 7. Tag zu atrophieren und konnten bereits nach dem 8. Tag (ROMANOFF 1960) nicht mehr bestimmt werden. Als Ausscheidungsorgan tritt die Vorniere niemals in Funktion.

Die Entwicklung der Urnieren (Mesonephros) ist von der Stimulation des Vornierenganges abhängig (GRÜNWALD 1937, BOSE 1965). Die exkretorischen Kanälchen der Urnieren treten bereits am 2. Tag der Bebrütung um die 40. - 45. Stunde auf (ROMANOFF 1960).

Die ersten Tubuli der Urniere sind noch rudimentär, die späteren besitzen bereits vollständig ausdifferenzierte Glomerula (FREEMAN und VINCE 1974). Die Urniere nimmt um den 4./5. Tag die Funktion als Ausscheidungsorgan auf, was von CHAMBERS und KEMPTON (1933) durch die Fähigkeit, Farben zu konzentrieren, belegt wurde. Der Funktionsbeginn wird durch die Fähigkeit der Tubuluszellen, Farben aufzunehmen und gegen einen Konzentrationsgradienten ins Tubuluslumen abzugeben, definiert. Durch Studien über die Aufnahme von Trypan-Blau legt HANAN (1927) den Funktionsbeginn auf den 4. Tag. Zu dem gleichen Ergebnis kommt auch BOYDEN (1924), der in seiner Arbeit die Hydronephrose an Schnitten des Wolf'schen Ganges untersuchte. Von KUO (1932 b) wird das Auftreten von wolkiger Flüssigkeit in der Allantois am 13. Tag als der Beginn der Funktion angesehen. Ab dem 12. Tag setzt die Degeneration der Urniere ein (FREEMAN und VINCE 1974). Die Aktivität der Xanthindehydrogenase, die die Bildung von Xanthin und Harnsäure katalysiert, steigt in der Urniere nach NEEDHAM (1926 b) ab dem 4. Tag steil an und erreicht am 14. Tag ein Maximum. In dieser Folge wurde von NEEDHAM (1926 b) die Widerspiegelung der evolutionären Entwicklung des Vogels gesehen. In späteren Untersuchungen (FISHER et al. 1967) konnte dieser Befund jedoch nicht bestätigt werden.

Am 4. Tag beginnt die Urniere Harnsäure und aus endogenem Arginin Harnstoff zu synthetisieren und auszuscheiden (FREEMAN und VINCE 1974). Von NEEDHAM

(1926 b) wurde eine maximale Ausscheidung von Ammoniak am 4., von Harnstoff am 9. und von Harnsäure am 11. Tag beobachtet. Die Menge an gebildetem Harnstoff wächst während der ersten Woche nur langsam und danach beschleunigt an (CLARK und FISHER 1957). Harnsäure kann wahrscheinlich ab dem 5. Tag mit dem Auftreten der Xanthindehydrogenase im Mesonephros synthetisiert werden. Ihre Bestimmung gelang CLARK und FISHER (1957) jedoch erst ab dem 7./8. Tag. Ab diesem Zeitpunkt ist laut ihren Untersuchungen Harnsäure das Hauptausscheidungsprodukt.

Die Nachniere (Metanephros) ist die definitive Niere der Reptilien, der Vögel und der Säugetiere. Ihre Entwicklung beginnt mit dem 4. Bebrütungstag. Am 11. Tag sind die sekretorischen Tubuli voll ausdifferenziert und können ihre Funktion aufnehmen (ROMANOFF 1960). Eine Synthese von Harnsäure und Harnstoff, sowie deren Ausscheidung beginnt mit dem 11. Tag (FREEMAN und VINCE 1974). Zum Ende der Bebrütung wird die Nachniere allein verantwortlich für die gesamte Ausscheidung (FREEMAN und VINCE 1974). Die Aktivität der Xanthindehydrogenase steigt nach NEEDHAM (1926 b) ab dem 12. Tag bis zum Schlupf hin steil an. Dieser Befund konnte von FISHER et al. (1967) nicht bestätigt werden. Ein vollständiger Harnstoff - Ornithin - Zyklus kann während der verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung nicht nachgewiesen werden (FREEMAN und VINCE 1974). Ein Anstieg der Arginase, die die Desamination von Arginin zu Harnstoff katalysiert, kann

nach der ersten Woche der Bebrütung in der Ur- und Nachniere festgelegt werden (CLARK und FISHER 1957).

2.3.4. Die Entwicklung der Thyreoidea

Schon am 2. Tag der Bebrütung zeichnet sich die Bildung der Schilddrüse beim Hühnerembryo als eine sich bald teilende Ausbuchtung der medioventralen Pharynxanlage ab (FALCONER 1971, FREEMAN und VINCE 1974, ROMANOFF 1960, WENTWORTH und RINGER 1976). Bis zum 5. Tag verliert sie die Verbindung zum Verdauungstrakt und wandert in die Richtung des 3. Aortenbogens (ROMANOFF 1960). THOMMES und PALL (1974) nehmen an, daß die Fähigkeit der Schilddrüse, Jodid zu konzentrieren, mit dem 5. Tag der Bebrütung ausgebildet wird. Dies ist die Voraussetzung für die Bildung von Mono- und Dijodthyronin. Um den 8. Tag der Entwicklung dringt Mesenchym zwischen das Schilddrüsengewebe und trennt die Drüsenzellen scheiben- und strangartig voneinander ab (BRADWAY 1929). Zwischen dem 10. und 13. Tag erscheinen, nachdem sich Gruppen von sekretorischen Zellen formiert und diese kleine Hohlräume umschlossen haben, Kolloidtröpfchen in den Drüsenzellen, wodurch der Beginn der Drüsenfunktion gekennzeichnet ist (SUN 1932). Diese Tröpfchen akkumulieren und füllen als extrazelluläres Kolloid den von Drüsenzellen umschlossenen Hohlraum aus. Von CODY (1980) wurde das aus Vorstufen gebildete L-Thyroxin bereits um den 10. Tag im Blutstrom gefunden. HANSBOROUGH und KHAN (1951), sowie STOLL und BLANQUET

(1953) schließen aus ihren Versuchen über die Inkorporation von radioaktivem Jod in die Schilddrüse, daß die Drüsenfunktion vom 10. bis 11. Tag einsetzt. THOMMES et al. (1977) konnten dann auch den Anstieg des L-Thyroxin im Blut, der um den 11. Tag zu beobachten ist, durch Hypophysektomie unterbinden. Eine Sensitivität der Adenohypophyse gegenüber dem Releasing-Hormon (TRH) und der Schilddrüse gegenüber Thyreotropin (TSH) scheint auf Grund der Versuche von THOMMES und HYLKA (1978) schon früher, nämlich um den 6. - 7. Tag gegeben zu sein. Ein deutlicher Hinweis, ob dem L-Thyroxin Anstieg ein entsprechender Anstieg von TRH und TSH zugrunde liegt, fehlt bis heute (THOMMES und HYLKA 1978, THOMMES und TONETTA 1979, THOMMES und JAMESON 1980). Nach Untersuchungen von MESS und STRAZNICKY (1970) kann die Schilddrüse ab dem 11. Tag durch Thyreotropin stimuliert werden.

Um den 15. Tag ist die Entwicklung der Schilddrüse abgeschlossen. SUN (1932) untersuchte die morphologische Struktur der Schilddrüse und fand ab dem 15. Tag keinen Unterschied mehr zur Drüse des adulten Huhnes. Der Durchmesser der Follikel nimmt durch Proliferation der Epithelien und Follikelfusion zu (FALCONER 1971). Im Gegensatz zum Säuger, bei dem die Schilddrüse in nachbarlicher Beziehung zum Kehlkopf verbleibt, verlagert sich die Thyreoidea beim Vogel weit nach kaudal, unmittelbar hinter die Brustapertur (NICKEL et al 1973). Die maximalen T_3 - und T_4 -Blutkonzentrationen fanden DECUYPERE et al. (1979) am Tag des Anpickens.

Bei den Tiere, die schon am Tag vor dem Anpicken die Luftkammermembran perforiert hatten, war der T_3 -Spiegel am höchsten. Der Anstieg des T_3 / T_4 - Verhältnisses vor dem Schlupf wird von DECUYPERE et al. (1980) auf eine Steigerung der peripheren Dejodierung zurückgeführt. Deren Blockierung erbrachte einen verminderten T_3 -Spiegel im Vergleich zur Kontrolle. Mc NABB et al. (1981) fanden ebenfalls nach Perforation der Luftkammermembran einen hohen T_3 -Spiegel. Im Plasma werden T_3 und T_4 mit der gleichen Bindungsaffinität an Albumin gebunden (TATA und SHELLABARGER 1959). FARER et al. (1962) zeigten, daß Thyroxin sowohl an Praealbumin als auch an Albumin gebunden wird. Nach REFETOFF et al. (1970) wird T_3 (Trijodthyronin) beim Haushuhn nicht an Praealbumin gebunden. Nach SHELLABARGER (1955) sind beim Vogel beide Hormone gleich wirksam. Dementgegen ist nach KLANDORF et al. (1981), ähnlich wie beim Säuger, T_3 als das metabolisch wirksamere Hormon anzusehen. Die Halbwertszeit des Thyroxin (T_4) im Plasma beträgt beim Haushuhn 8,3 Stunden, die des T_3 7,2 Stunden (HENNINGER und NEWCOMER 1964).

2.4. Zielsetzung

Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, ist schon lange bekannt, daß das Schlupfgeschehen beim Hühnerembryo durch die Applikation von L-Thyroxin beschleunigt und durch Thioharnstoff verzögert werden kann. Bis heute konnte aber nicht geklärt werden, wie diese Effekte zustande kommen. Da die Entwicklung und Differenzierung über die Nukleinsäuren gesteuert werden, ist die Vermutung naheliegend, daß mit L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff in den Nukleinsäurestoffwechsel eingegriffen wird. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Versuch unternommen werden, die Auswirkungen dieser Substanzen auf den DNA-Stoffwechsel zu untersuchen. Gleichzeitig wurde einmal die DNA-Synthese und der DNA-Gehalt der Leber, Lunge und Niere verfolgt. Außerdem wurde das Gewicht dieser Organe, sowie das Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis bestimmt. Schließlich wurde untersucht, inwieweit der Applikationszeitpunkt der oben genannten Substanzen für die Auswirkungen auf das Schlupfgeschehen und den DNA-Stoffwechsel von Bedeutung ist.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

3.1.1. Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen wurden an den Organen (Leber, Lunge und Niere) von Hühnerembryonen der Rasse Weißes Leghorn (LSL) durchgeführt. Die Bruteier wurden von dem Versuchsgut Heinrichsruh bezogen. Die Bebrütung der Eier erfolgte in institutseigenen Brutschränken bei einer Temperatur von 37 - 38 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63 - 67 %.

3.1.2. Reagentien

- | | |
|--|----------------------------|
| - Sucrose | Fa. Merck, Darmstadt |
| - Diphenylamin | Fa. Merck, Darmstadt |
| - Essigsäure | Fa. Merck, Darmstadt |
| - Perchlorsäure | Fa. Merck, Darmstadt |
| - Acetaldehyd | Fa. Merck, Darmstadt |
| - Desoxyribonukleinsäure
aus Kalbsthymus | Fa. Sigma, München |
| - (6- ³ H) Thymidin
Radioaktive Konzentration:
37,0 mBq/ml (1,0 mCi/ml) | Fa. Amersham, Braunschweig |
| - L-Thyroxin | Fa. Henning, Berlin |
| - Thioharnstoff | Fa. Merck, Darmstadt |

- Quicksint^R 212 Fa. Zinsser, Frankfurt
Standard Szintillator für
wässriges Probenmaterial, bis ca. 20 %
Wasseraufnahme, phasenfrei
- Oxiluma^R Fa. Baker, Deventer NL
LSC Cocktail für wässrige
Tritium Proben in Oxidizern
- Packard SPEC CHEC^R - ^3H Fa. Packard, Frankfurt
Tritium für Proben-Oxidizer

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck,
Darmstadt bezogen und waren von pro analysi Qualität.

3.1.3. Geräte

- Packard Tri-Carb Proben Oxidizer Fa. Packard,
Frankfurt
- Packard Tri-Carb Flüssigkeits- Fa. Packard,
szintillationszähler Frankfurt
- Eppendorf Photometer 1101 M Fa. Eppendorf,
Hamburg
- Braun Potter Fa. Braun,
Melsungen

3.1.4. Herstellung und Konzentration der verwendeten Lösungen

Diphenylamin-Lösung

3g Diphenylamin in etwas Eisessig gelöst. Dazu 3 ml
konzentrierte Schwefelsäure und mit Eisessig auf 200
ml aufgefüllt.

DNA-Standard

Stammlösung: 5 mg DNA auf 100 ml mit Aqua bidest
(50 µg/ml)

Standardverdünnung: 1 ml Stammlösung + 3 ml 0,5 molare Perchlorsäure
(12,5 µg/ml)

Acetaldehyd-Lösung 2 %

Hergestellt und aufbewahrt bei 4 °C.

³H-Thymidin-Standard

10 µl ³H-Thymidin-Stammlösung auf 10 ml mit Aqua bidest.

³H-Thymidin-Verdünnung

5 ml Stammlösung mit 45 ml Aqua bidest auf 50 ml.
In 50 Portionen zu je 1 ml abgefüllt und tiefgefroren gelagert (- 20 °C). Radioaktive Konzentration pro Portion: 3700 uBq = 100 uCi/ml

Thioharnstoff

Konzentrationen für die Applikation am 10.Tag:

- a) 60 mg Thioharnstoff mit Aqua bidest auf 2 ml
= 394,1 mmol
- b) 5 mg Thioharnstoff mit Aqua bidest auf 2 ml
= 32,8 mmol

Konzentration für die Applikation am 17.Tag:

100 mg Thioharnstoff mit Aqua bidest auf 10 ml
= 131,3 mmol

L-Thyroxin

Konzentrationen für die Applikation am 10.Tag:

- a) 1,0 mg L-Thyroxin in 200 µl 0,25 normaler Natronlauge gelöst und mit Aqua bidest auf 50 ml aufgefüllt = 0,028 mmol
- b) 0,125 mg L-Thyroxin, gelöst wie oben und mit Aqua bidest auf 50 ml = 0,0035 mmol

Konzentration für die Applikation am 17.Tag: 3 mg L-Thyroxin in 200 μ l 0,25 normaler Natronlauge gelöst und mit Aqua bidest auf 50 ml aufgefüllt = 0,0844 mmol

Bei allen 3 Lösungen wurde anschließend ein pH Wert von 9 eingestellt.

3.2. Methode

3.2.1. Applikation der Substanzen

Als Applikationsort wurde die Luftkammer gewählt, da bei dieser Methode ein Eröffnen der inneren Eihaut nicht stattfindet und die Möglichkeit von Infektionen und Verletzungen relativ gering gehalten ist. Bei aufrechter Stellung kommt die Keimscheibe in der Regel direkt unter der Luftkammer zu liegen, wodurch eine gute Resorption und Verteilung im Embryo gewährleistet ist. Untersuchungen von KAICK und GRÖTTLER (1968) ergaben, daß die Diffusion von applizierten Substanzen in den Chorion-Allantois-Kreislauf schon nach wenigen Stunden abgeschlossen ist. Die Lösungen von L-Thyroxin und Thioharnstoff wurden am Morgen des 10. oder 17. Tag nach vorangegangenen Schieren der Eier in die Luftkammer appliziert. Dazu wurde mit einer feinen Kanüle die Eischale durchstoßen. Anschließend wurden die gelösten Substanzen mit einer 1 ml Tuberkulinspritze appliziert und die Öffnung in der Eischale mit einem Kleber (Uhu) verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden in aufrechter Stellung wurden die Eier wieder in die waagerechte Position gebracht und weiter bebrütet. von den oben genannten Substanzen wurden folgende Mengen pro Ei appliziert:

Thioharnstoff am 10. Tag:

a) 3,0 mg/0,1 ml = 39,41 umol

b) 0,25mg/0,1 ml = 3,28 umol

Thioharnstoff am 17. Tag:

2,5 mg/0,25ml = 32,84 umol

L-Thyroxin am 10. Tag:

a) 0,00025 mg/0,1 ml = 0,00035 umol

b) 0,002 mg/0,1 ml = 0,0028 umol

L-Thyroxin am 17. Tag:

0,012 mg/0,2 ml = 0,0168 umol

Thymidin ist die einzige der vier in den Nukleinsäuren vorkommende Base, die nur in die DNA eingebaut wird und somit als ein Maß für die DNA-Synthese benutzt werden kann. Aus diesem Grund wurde zur Messung der DNA-Synthese in den einzelnen Organen radioaktiv markiertes Thymidin verwendet. Die Applikation der ^3H -Thymidin-Lösung erfolgte ebenfalls nach der oben angegebenen Methode in die Luftpumpe. Pro Ei wurden 0,5 ml der Lösung (1850 uBq = 50 uCi /Ei) appliziert. Im ersten Abschnitt der Arbeit erstreckte sich der Untersuchungszeitraum vom 17. bis zum 20. Tag der Inkubation. Im zweiten Teil wurde vom 10. bis zum 16. Tag untersucht. Pro Tag wurden 8 - 10 Eier im Abstand von 5 Minuten mit der ^3H -Thymidin-Lösung behandelt. Die Applikation an den verschiedenen Bebrütungstagen mußte immer um die gleiche Uhrzeit (8 - 10 Uhr) erfolgen, um so ein weitgehend einheitliches Versuchsmaterial zu gewährleisten. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß der verabreichten Substanzen auf das Schlupfgeschehen untersucht. Dabei wurde der Schlupf-

zeitpunkt mit dem der Kontrolle verglichen. Außerdem wurde das Gewicht der geschlüpften Embryonen als Wachstumsparameter herangezogen. Schließlich wurde registriert, ob eine Applikation der Substanzen eine letale Wirkung zur Folge hat.

3.2.2. Entnahme der Organe

Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Eier dem Brutschrank entnommen und das Gewicht festgestellt. Das Ei wurde dann am stumpfen Pol im Bereich der Luftkammer mit einer Schere im Kreisschnitt eröffnet, die noch intakte Eihaut zerstört, der Eiinhalt ausgegossen, der Embryo mit einer Pinzette entnommen und auf Zellstoff abgetupft. Anschließend wurde der Embryo mit einem Scherenschlag dekapitiert. Nach Entfernen des Dotters wurden Rumpf und Kopf in ein Becherglas gegeben und davon das Gewicht bestimmt. Die Bestimmung der Gewichte war notwendig um eine spätere Berechnung des Gewichtsverhältnisses Ei/Embryo durchführen zu können. Jetzt konnten Leber, Lunge und Niere entnommen werden. Alle Organe wurden sofort in vorher abgewogene und beschriftete Alufolie verpackt und auf Eis gekühlt. Die endgültige Lagerung bis zur Aufarbeitung erfolgte in tiefgefrorenem Zustand (- 20 °C).

3.2.3. Aufarbeitung der Organe

3.2.3.1. Isolierung der Zellkerne

Die Zellkernisolierung aus den mit 6-³H-Thymidin markierten Organen (Leber, Lunge und Niere) der Hühnerembryonen wurde modifiziert nach WIDNELL und TATA (1964) durchgeführt.

Alle Schritte wurden bei 0 - 4 °C ausgeführt. Zuerst mußte das Gewicht der bei - 20 °C gelagerten Organe ermittelt werden. Nach Zugabe der 9 fachen Menge (w/v) an 0,32 molarer Sucrose-Lösung (3 mMol/l MgCl_2 , pH 7,3) wurden die Organe mit 8 - 12 Schlägen bei 1200 Umdrehungen/Minute (Upm) zu einem Homogenat gepottet. Je Homogenat wurde 2 mal 1 ml Aliquot entnommen und in Reagenzgläsern in einer Sigma-Zentrifuge 10 Minuten bei 120 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Reagenzgläser ausgewischt. Zur weiteren Verarbeitung mußte der Niederschlag mit 200 ul einer 0,32 molarer Sucrose-Lösung aufgelöst werden und in Eppendorf-Röhrchen übergeführt, wurde mit 1000 ul einer 60 % Sucrose-Lösung aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein Abzentrifugieren des vorher gut geschüttelten Röhrcheninhaltes bei 5000 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde erneut verworfen. Der Niederschlag bestand nun aus intakten Zellkernen.

3.2.3.2. DNA-Bestimmung mit Diphenylamin nach BURTON (1956)

Purinegebundene Desoxyribose ergibt mit in Eisessig gelöstem Diphenylamin unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure eine blaue Verbindung unbekannter Natur (BURTON 1956).

Nach Verwerfen des Überstandes im vorangegangenen Arbeitsgang (s.o. 3.2.3.1.) wurde die an den Wänden der Eppendorf-Röhrchen haftende Flüssigkeit durch Abtropfen und Auswischen aufs Gründlichste beseitigt. Der verbliebene Niederschlag (intakte Zellkerne) wurde nun mit 2 mal 1 ml 0,25 molarer Perchlorsäure gelöst und in ein Reagenzglas übergeführt. Zusätzlich wurden die Wände der Reagenzgläser mit je

1 ml der 0,25 molaren Perchlorsäure nachgewaschen. Der so versetzte Niederschlag mußte jetzt mindestens 30 Minuten bei 4 °C stehen bleiben. Im nächsten Schritt wurde 15 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen mit anschließendem Abtropfen und Auswischen der Reagenzgläser. Der verbliebene Niederschlag wurde mit 1 ml 0,5 normaler Natronlauge aufgenommen und 30 Minuten bei 22 - 24 °C im Wasserbad geschüttelt. Danach wurde die Probe halbiert und jeweils mit 4,5 ml 0,5 molarer Perchlorsäure versetzt. Nach mindestens 30 Minuten Stehen bei 4 °C wurde wiederum abzentrifugiert und der Niederschlag mit 2,5 ml der 0,5 molaren Perchlorsäure aufgenommen. Danach wurde die Probe 20 Minuten bei 95 °C hydrolisiert, anschließend 10 Minuten zentrifugiert (5000 x g) und der Überstand sorgfältig abgehoben. Der Niederschlag wurde nochmals mit 2,5 ml der 0,5 molaren Perchlorsäure versetzt, 20 Minuten im Wasserbad hydrolisiert, 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit dem vorhergehenden vereinigt. Das Gesamtvolumen betrug nun 5,0 ml. In Reagenzgläsern wurden nun 0,5 ml der 0,5 molaren perchlorsauren Probenlösung mit 1 ml Diphenylamin-Acetaldehyd-Lösung gemischt und im Dunklen 22 Stunden inkubiert.

Zur Auswertung des Materials wurden Doppelproben angelegt und der Mittelwert errechnet. Proben und Standardlösung wurden bei 590 nm gegen einen Nullwert gemessen.

Nullwert: 0,5 ml 0,5 molarer Perchlorsäure + 1 ml
Diphenylamin-Acetaldehyd-Lösung

DNA-Standard: 1 ml Stammlösung (s.o. 3.1.4.) + 3 ml
0,5 molare Perchlorsäure (12,5 ug DNA/ml)

Die Diphenylamin-Lösung und die Acetaldehyd-Lösung wurden in einem Verhältnis von 20 : 0,1 gemischt.

3.2.3.3. Radioaktivitätsmessung markierter DNA

Für die Messung im Tri-Carb Flüssigkeitsszintillationszähler wurden 3-fach Proben angelegt. Dazu wurde je 1 ml der 0,5 molaren perchlorsauren Probenlösung (s.o. 3.2.3.2.) in ein Szintillationsfläschchen pipettiert und 10 ml einer fertigen Szintillationsflüssigkeit (Quicksint^R 212) zugefügt. Als Nullwert diente 1 ml 0,5 molare Perchlorsäure mit 10 ml Quicksint^R 212 versetzt. Gleichzeitig wurde ein Standard im Zähler mitgeführt.

6 - ³H-Thymidin-Standard: 10 ul Standard (s.o. 3.1.4.)
+ 1 ml 0,5 molare Perchlorsäure + 10 ml Quicksint^R 212

Die Radioaktivität des Standards wurde jeden Monat anhand einer dafür angelegten Quenchkurve bestimmt. Diese Quenchkurve wurde mit internen Tritium-Standards (Packard) erstellt. Damit konnte die effektive Ausbeute des Zählers bestimmt, ein Nachlassen der Aktivität des Standards überprüft und ein Multiplikationsfaktor ermittelt werden, der benötigt wurde, um die Radioaktivität in Zerfällen pro Minute/ug DNA (DPM) angeben zu können.

Die eingestellte Zählzeit der Proben betrug 10 Minuten. Aus den 3-fach Proben wurde ein Mittelwert errechnet und der Nullwert abgezogen.

3.3. Kontrolle der Anflutung im gesamten Organ

Um eine gleichmäßige Verteilung der applizierten 6 - ^3H -Thymidin-Lösung im Embryo und den einzelnen Organen zu überprüfen, wurde eine Kontrolle der Gesamt-Radioaktivität pro Organ (Leber, Lunge und Niere) bei den verschiedenen Gruppen (Kontrolle und Probanden) an den verschiedenen Befruchtungstagen durchgeführt. Hierzu wurde von dem in 3.2.4.1. beschriebenen Organ-Homogenat eine Menge von 100 μl benötigt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verarbeitung bei - 20 $^{\circ}\text{C}$. Das Probenmaterial wurde in vorbereitete Packard Cups pipettiert und im Packard Tri-Carb Proben Oxidizer verbrannt. Die Verbrennungszeit betrug 10 Sekunden und als Szintillationsflüssigkeit wurden 11 ml Oxiluma^R (Baker) hinzugefügt. Zur Überprüfung des Gerätes wurden 3 mal 50 μl SPEC-CHEC^R- ^3H (Tritium für Proben Oxidizer) verbrannt und ausgewertet. Die im Packard Tri-Carb Flüssigkeitsszintillationszähler eingestellte Zählzeit betrug 1 Minute. Die Radioaktivität wurde über eine Quenchkurve bestimmt und rechnerisch auf das Gewicht des Organs in Angaben von DPM/mg bezogen. Die Werte sind in Tabelle I aufgeführt. Dieser ist zu entnehmen, daß die Proben der 3 untersuchten Organe im gesamten Untersuchungszeitraum durch annähernd gleiche Werte gekennzeichnet sind. Daraus kann geschlossen werden, daß unter den gegebenen Bedingungen eine gleichmäßige Verteilung der Radioaktivität auf die untersuchten Organe gewährleistet ist.

Tabelle I

Verteilung der 6 - ^3H -Thymidin-Lösung auf Leber, Lunge und Niere.
Angaben in DPM/mg Organ (n = 8)

Entwick- lungstag	Organ	Kontrolle	L-Thyroxin 0,0035mmol	Thioharnstoff 394,1 mmol
10	Leber	5345 $\pm$ 978		
	Lunge	6280 $\pm$ 1235		
	Niere	5408 $\pm$ 992		
11	Leber	5059 $\pm$ 988	4870 $\pm$ 1002	4929 $\pm$ 987
	Lunge	5853 $\pm$ 1008	5240 $\pm$ 988	4911 $\pm$ 854
	Niere	5998 $\pm$ 987	5812 $\pm$ 1146	5927 $\pm$ 1006
12	Leber	5816 $\pm$ 1105	5720 $\pm$ 1115	6398 $\pm$ 1122
	Lunge	4933 $\pm$ 879	4723 $\pm$ 964	4852 $\pm$ 955
	Niere	5392 $\pm$ 966	5117 $\pm$ 899	5335 $\pm$ 1076
13	Leber	5569 $\pm$ 1023	5080 $\pm$ 1007	6020 $\pm$ 1123
	Lunge	5627 $\pm$ 1145	5600 $\pm$ 978	6315 $\pm$ 1234
	Niere	5831 $\pm$ 1006	5435 $\pm$ 855	5941 $\pm$ 925
14	Leber	4465 $\pm$ 879	4300 $\pm$ 972	5967 $\pm$ 978
	Lunge	5499 $\pm$ 999	5228 $\pm$ 1184	4876 $\pm$ 1145
	Niere	5388 $\pm$ 1122	5400 $\pm$ 1071	5823 $\pm$ 1178
15	Leber	4128 $\pm$ 789	4808 $\pm$ 932	4416 $\pm$ 966
	Lunge	5572 $\pm$ 867	5203 $\pm$ 879	5348 $\pm$ 983
	Niere	5467 $\pm$ 855	5800 $\pm$ 1003	5920 $\pm$ 945
16	Leber	6377 $\pm$ 1234	5809 $\pm$ 1187	6112 $\pm$ 1162
	Lunge	5340 $\pm$ 879	5400 $\pm$ 1042	5040 $\pm$ 1056
	Niere	5624 $\pm$ 1112	5566 $\pm$ 1192	5412 $\pm$ 1141

3.4. Bestimmung des L-Thyroxin-Blutspiegels

Die Eröffnung der Eier erfolgte am stumpfen Pol im Bereich der Luftkammer mittels einer Schere im Querschnitt. Anschließend mußte die innere Eihaut sehr vorsichtig entfernt werden, um möglichst wenige Gefäße zu verletzen. Der Eiinhalt wurde nun nur so weit ausgegossen, bis der Dottersack in einer Petrischale zum Liegen kam. Die umbilikalen Gefäße (A. und V. umbilicalis sinistra) waren jetzt gut gespannt und eine direkte Blutentnahme aus der Vena umbilicalis sinistra mittels einer Kanüle (Stärke 18) auf einer 1 ml Tuberkulinspritze war möglich. Das gewonnene Blut wurde sofort in Eppendorf-Röhrchen 10 Minuten lang bei 3000 x g abzentrifugiert und das sorgfältig abgehobene Serum bei - 20 °C aufbewahrt.

Die Bestimmung des L-Thyroxin-Blutspiegels mittels eines Radio-Immun-Assay (RIA) wurde mit Kits der Firma Clinical Assay durchgeführt.

3.5. Statistische Berechnung

Die Werte, die in den Abbildungen dargestellt werden, sind Mittelwerte ($\bar{x}$) mit den jeweiligen Standardabweichungen ($\pm s$). Die Anzahl der Embryonen (n) ist in den Abbildungen aufgeführt.

Mit Hilfe des U-Testes von WILCOXON, MAN und WITHNEY (1974), der den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben ermöglicht, wurde die Signifikanz ermittelt.

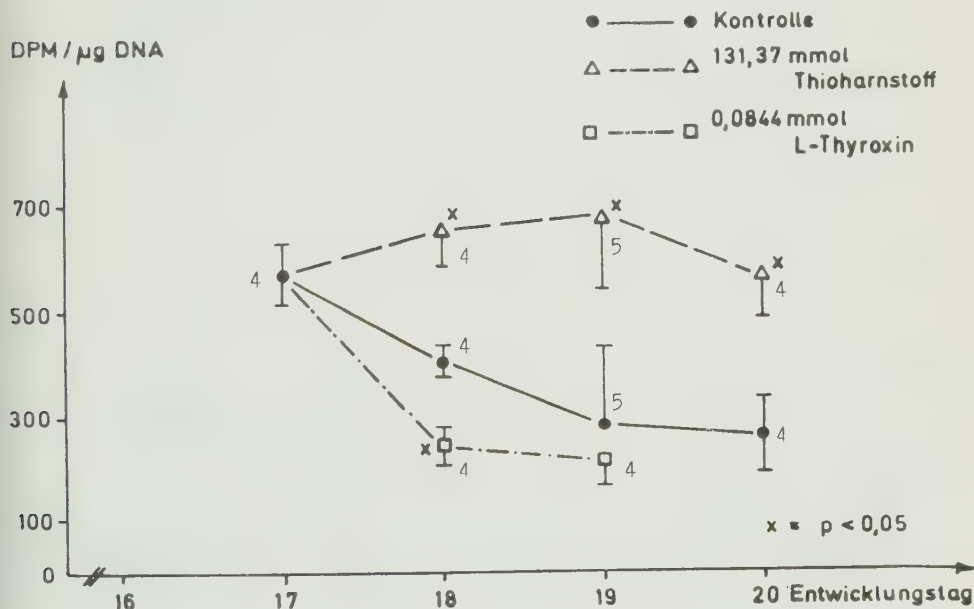
4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen vom 17. - 20. Tag der Inkubation

4.1.1. Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den Thymidin-Einbau in die DNA der Leber, Lunge und Niere

In der Abb.3 fällt die besonders hohe Thymidin-Einbaurate der Niere auf. Sie ist im Vergleich zur Leber (Abb. 1) 4 - 6 mal und im Vergleich zur Lunge (Abb. 2) 2 mal höher. In allen 3 Organen verringert sich

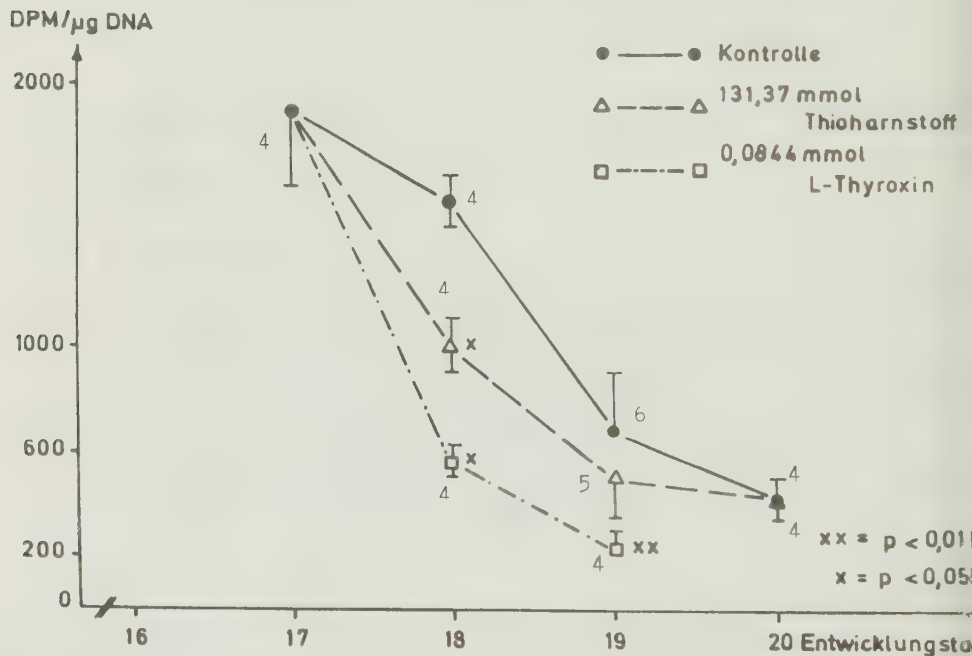
Abb.1: DNA-Synthese der Leber unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff



der Thymidin-Einbau in die DNA vom 17. - 20. Tag der Inkubation. Besonders ausgeprägt ist der Abfall in der Lunge und der Niere.

Wurden die Embryonen am 17. Tag mit L-Thyroxin behandelt, so wurde dadurch der Thymidin-Einbau in allen 3 Organen gleichzeitig verringert (Abb. 1 - 3). Eine Applikation von Thioharnstoff verhinderte in der Leber den durch die Kontrolle vorgegebenen Abfall des Thymidin-Einbaus und verlangsamte ihn in der Niere. Demge-

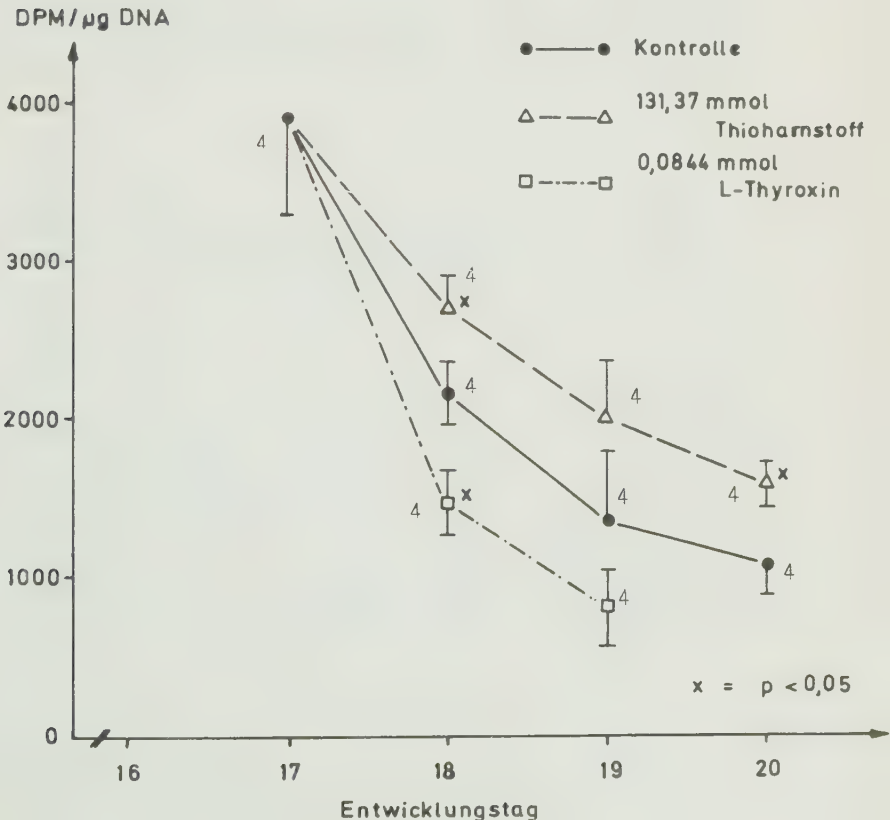
Abb.2: DNA-Synthese der Lunge unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff



genüber verursacht Thioharnstoff in der Lunge (Abb. 2) einen ebenfalls beschleunigten Abfall des Thymidin-Einbaus. Dieser war jedoch deutlich geringer, als der im Falle von L-Thyroxin.

Für die Untersuchungen wurden die Informationen aus der Literatur benutzt, wonach die Applikation von L-Tyroxin bzw. Thioharnstoff am 17. Tag in das Ei einen vorzeitigen bzw. verzögerten Schlupf (24 Stunden) zur Folge hat. Diese Effekte konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Abb.3: DNA-Synthese der Niere unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff



4.2. Untersuchungen vom 10. - 16. Tag der Inkubation

4.2.1. Allgemeine Untersuchungen

4.2.1.1. Beeinflussung des Schlupfgeschehens

Die Ergebnisse über die Auswirkungen von verschiedenen Konzentrationen an L-Thyroxin auf den Schlupf sind in der Tabelle II wiedergegeben. Danach wirkten sich L-Thyroxin-Mengen in einem Bereich von 1,4 - 2,8 nmol, am 10. Tag in die Luftkammer appliziert, tödlich auf die Embryonen aus. Auswirkungen auf den Zeitpunkt des Schlupfes konnten bei den verschiedenen Mengen an L-Thyroxin nicht beobachtet werden. Relativ gering war die Absterberate bei einer Menge von 0,35 nmol. Diese Menge wurde dann auch in den folgenden Versuchen eingesetzt. Wie aus der Tabelle IV hervorgeht, wiesen die mit dieser Menge L-Thyroxin behandelten Embryonen im Durchschnitt ein etwas erhöhtes Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis im Vergleich zur Kontrolle auf.

Tabelle II

Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen an L-Thyroxin auf das Schlupfgeschehen

appliz. Menge L-Thyroxin in nmol	2,8	1,4	0,7	0,35	0,17
Anzahl der be- handelten Tiere	40	32	36	40	20
abgestorbene Em- bryonen	40	32	32	10	6
Schlupftag	--	--	22.	22.	22.

Im Gegensatz zu L-Thyroxin hatten die eingesetzten Mengen an Thioharnstoff keine letalen Auswirkungen innerhalb der regulären Bebrütungszeit zur Folge, zumindest erhöhte sich die Anzahl der abgestorbenen Embryonen im Vergleich zur Kontrolle nicht. Es zeigte sich aber ein deutlicher Effekt auf den Schlupfvergang. Wurde die eingesetzte Menge an Thioharnstoff von 3,28 auf 26,28 umol erhöht, so führten diese Embryonen den Schlupf am 22. Tag nicht mehr durch. Sie pickten zwar die Eischale am 21. Tag an, starben aber innerhalb der nächsten 24 Stunden ab. Unter dem Einfluß von 39,41 umol Thioharnstoff pickten die Embryonen die Eischale am 25. Tag an, kamen aber ebenfalls nicht zum Schlupf, obgleich einige von ihnen bis zum 28. Tag überlebten. Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Embryonen, die mit 65,69 umol Thioharnstoff behandelt wurden. Für die weiteren Versuche wurden 39,41

Tabelle III

Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen an Thioharnstoff auf das Schlupfgeschehen

appliz. Menge						
Thioharnstoff						
in umol	3,28	6,57	13,14	26,28	39,41	65,69
Anzahl der be-						
handelten Tiere	30	16	25	9	9	10
geschlüpfte Em-						
bryonen	24	12	17	0	0	0
Schlupftag	22.	22.	22.	-	-	-

Tabelle IV

Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis unter dem Einfluß von
L-Thyroxin und Thioharnstoff

Bebrütungs- tag	Kontrolle	L-Thyroxin 0,0035mmol	Thioharnstoff 394,1mmol
10	19,58 ± 1,15 n=8		
11	14,64 ± 3,54 n=8	18,29 ± 2,15 n=10	15,52 ± 1,16 n=9
12	10,90 ± 1,30 n=8	12,50 ^x ± 1,49 n=10	10,47 ± 0,98 n=9
13	7,87 ± 1,13 n=8	8,39 ± 1,14 n=10	7,65 ± 0,61 n=9
14	5,56 ± 0,46 n=8	5,80 ± 0,47 n=10	5,74 ± 0,48 n=9
15	4,24 ± 0,59 n=8	4,44 ± 0,58 n=10	4,58 ± 0,58 n=9
16	3,00 ± 0,16 n=8	3,56 ^{xxx} ± 0,36 n=10	3,70 ^{xxx} ± 0,58 n=9

x p≤0,05

xxx p≤0,001

umol Thioharnstoff eingesetzt. Es war dies die geringste Menge, bei der eine Schlupfverzögerung zu sehen war. Wie die Tabelle IV zeigt, hatte diese Thioharnstoff-Menge mit Ausnahme vom 16. Tag der Inkubation keinen deutlichen Einfluß auf das Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis.

4.2.2. Spezielle Untersuchungen

4.2.2.1. Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den Thymidin-Einbau in die DNA der untersuchten Organe

Im Vergleich zu den Untersuchungen, die gegen Ende der Inkubation durchgeführt wurden (vgl. Abschnitt 4.1.1.), war der Thymidin-Einbau in die Kernfraktion im Fall von allen 3 Organen weitaus höher. Allerdings war auch in dieser Entwicklungsphase ein Abfall des Thymidin-Einbaus in der Leber (Abb. 4 und 5) und der Lunge (Abb. 6 und 7) zu beobachten. Demgegenüber blieben die Werte für die Niere (Abb. 8 und 9) auf annähernd gleichem Niveau.

Wurden die Embryonen mit 0,35 nmol L-Thyroxin behandelt, so führte dies zu einem raschen Abfall des Thymidin-Einbaus in allen 3 Organen (Abb. 4, 6 und 8). Wurden an Stelle von L-Thyroxin 39,41 umol Thioharnstoff appliziert, so verursachte auch dies in allen 3 Organen einem stärkeren Abfall des Thymidin-Einbaus (Abb. 5, 7 und 9). Dabei unterschied sich das Ausmaß des verringerten Einbaus im Durchschnitt kaum von dem, der durch L-Thyroxin ausgelöst wurde.

Dieser Befund war insofern überraschend, als bei einer Applikation von Thioharnstoff mit einem zum L-Thyroxin

Abb.4: DNA-Synthese der Leber unter dem Einfluß von L-Thyroxin

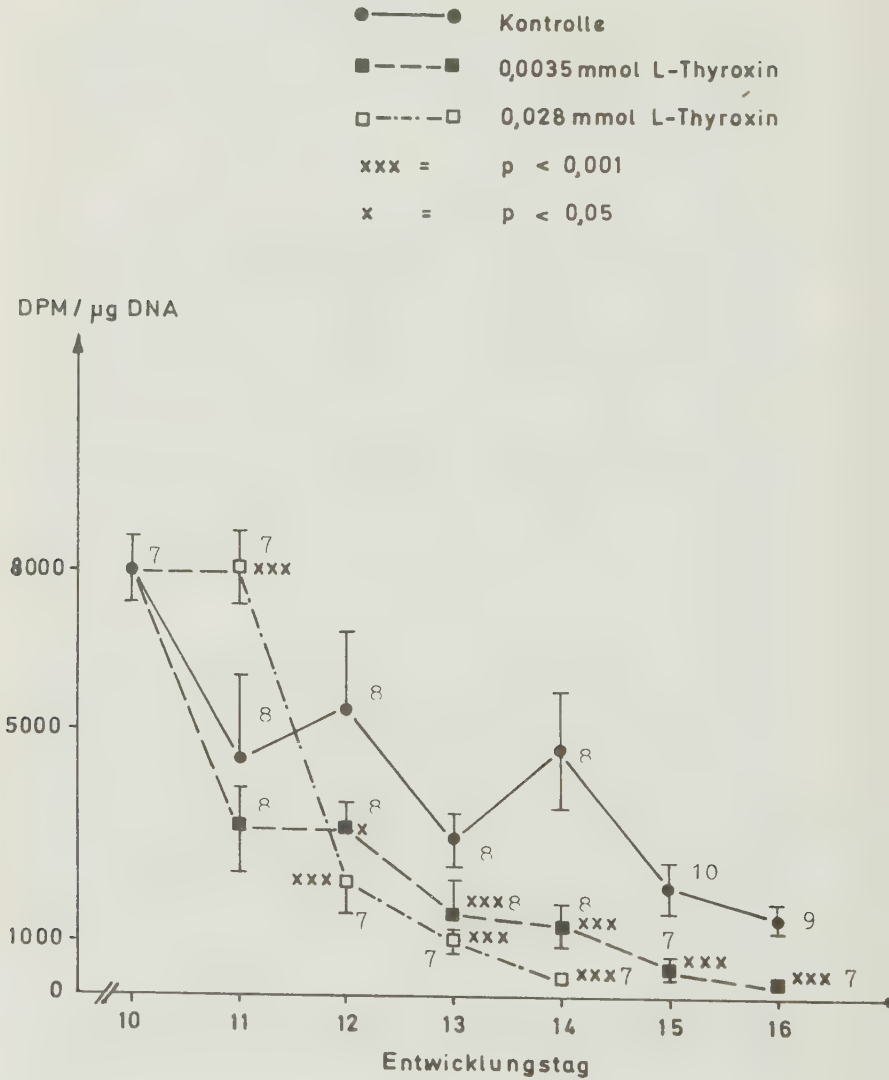


Abb.5: DNA-Synthese der Leber unter dem Einfluß von Thioharnstoff

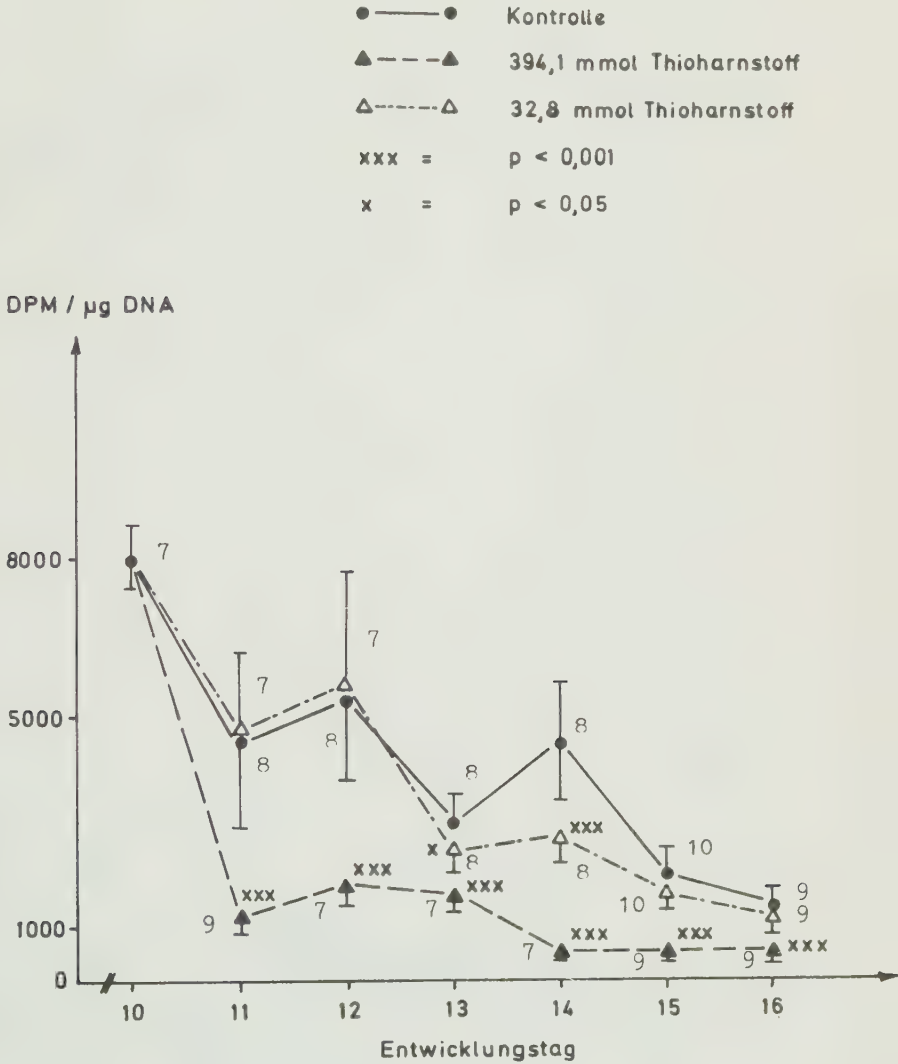


Abb.6: DNA-Synthese der Lunge unter dem Einfluß
von L-Thyroxin

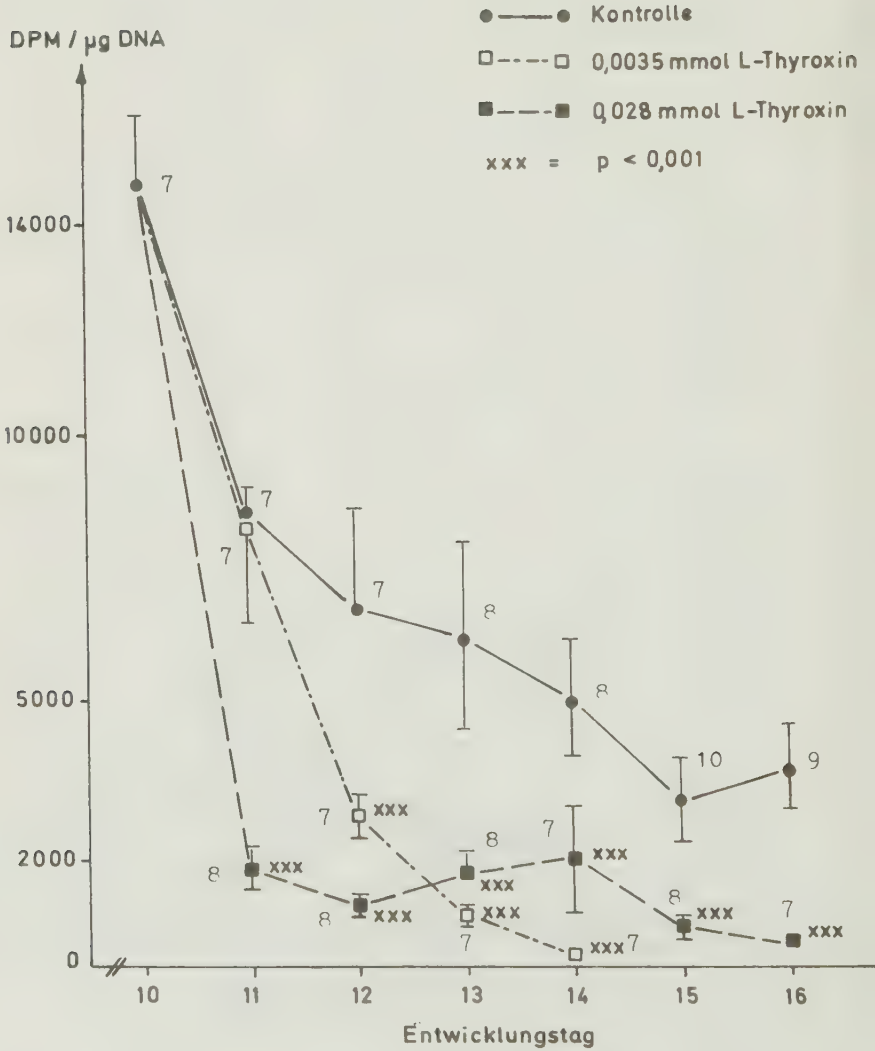


Abb.7: DNA-Synthese der Lunge unter dem Einfluß
von Thioharnstoff

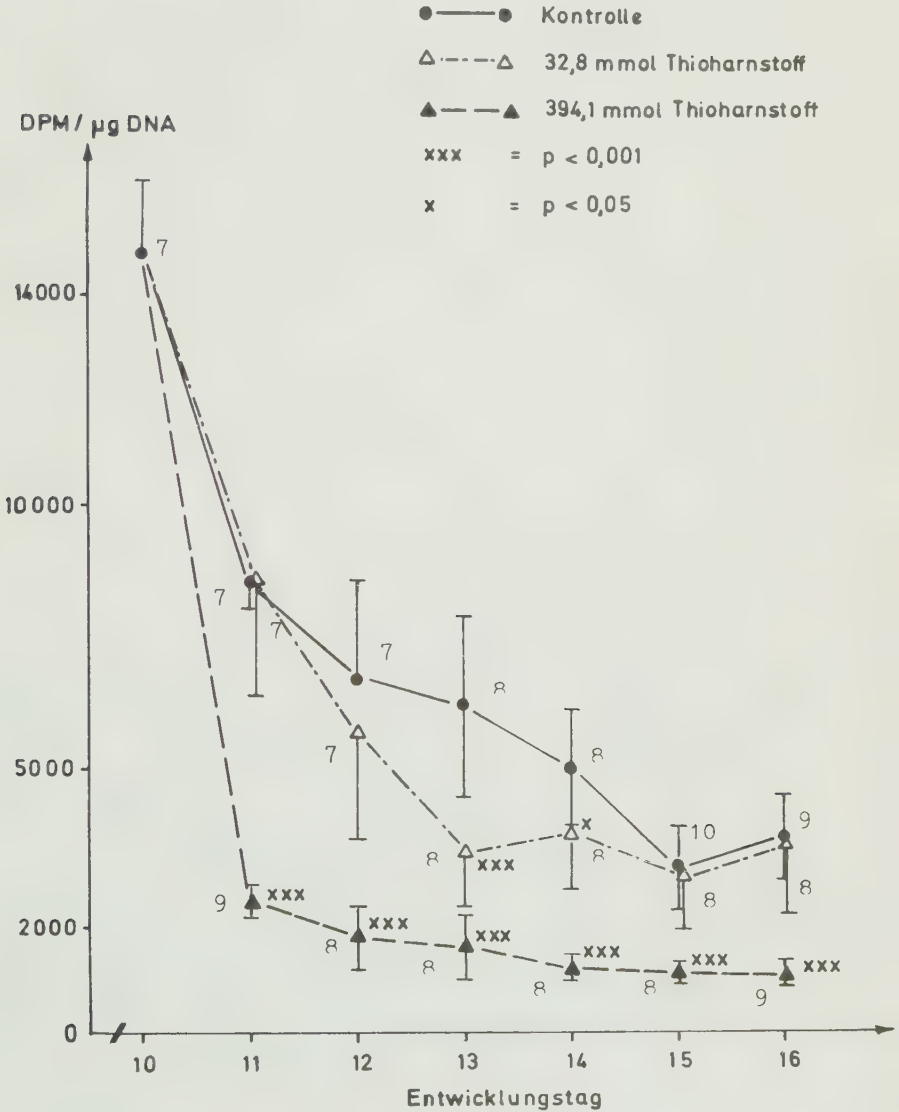


Abb. 8 : DNA-Synthese der Niere unter dem Einfluß
von L-Thyroxin

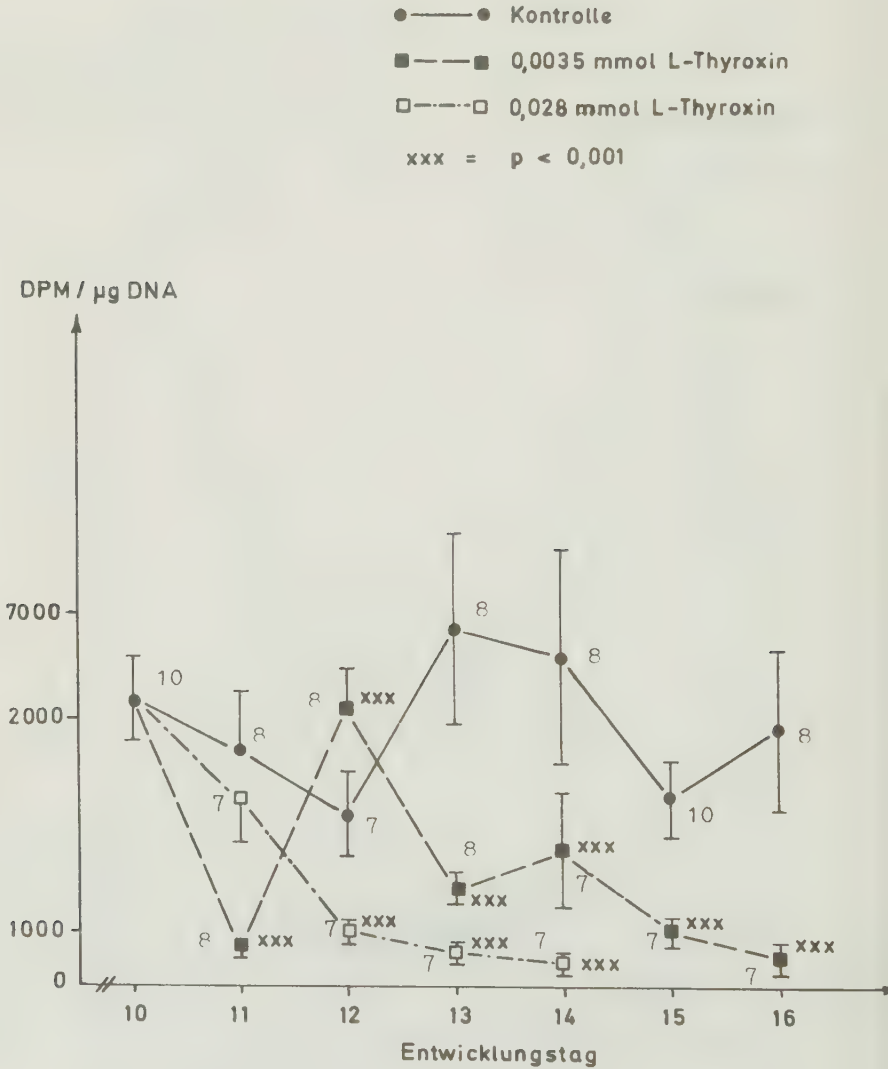
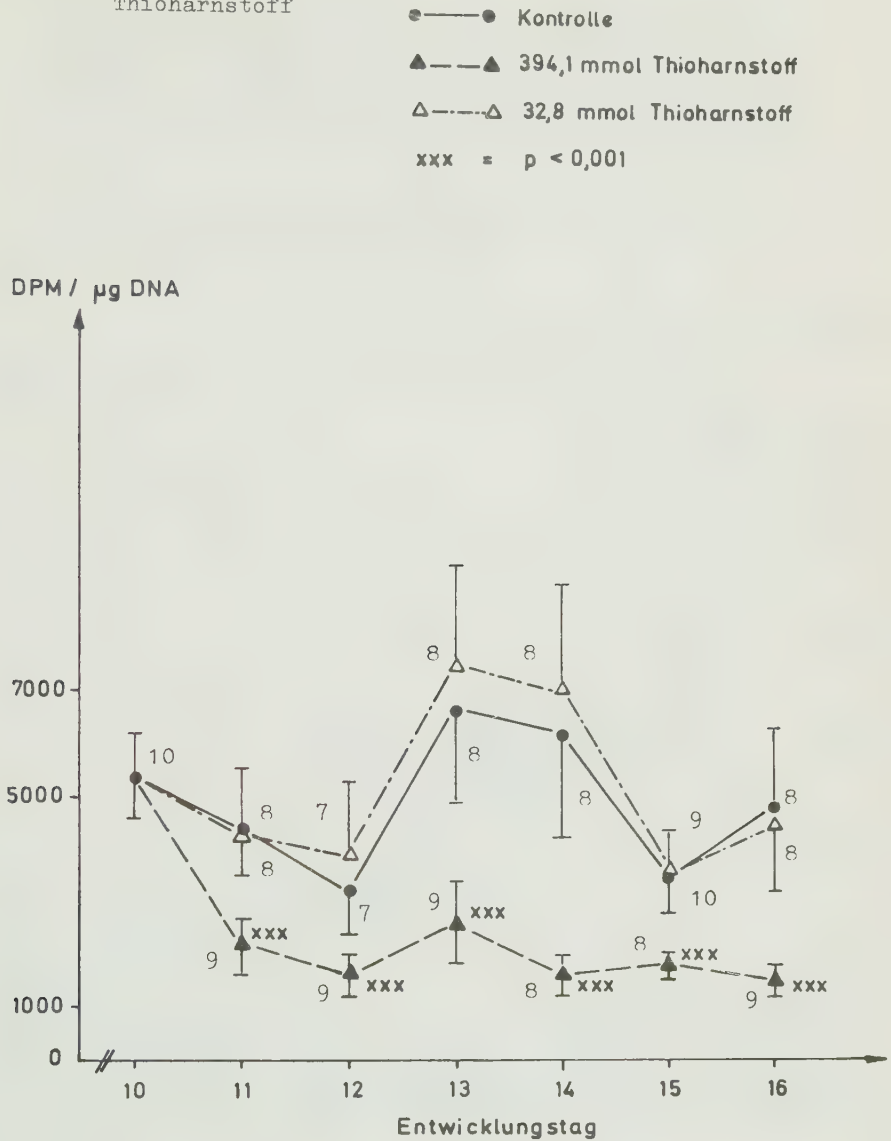


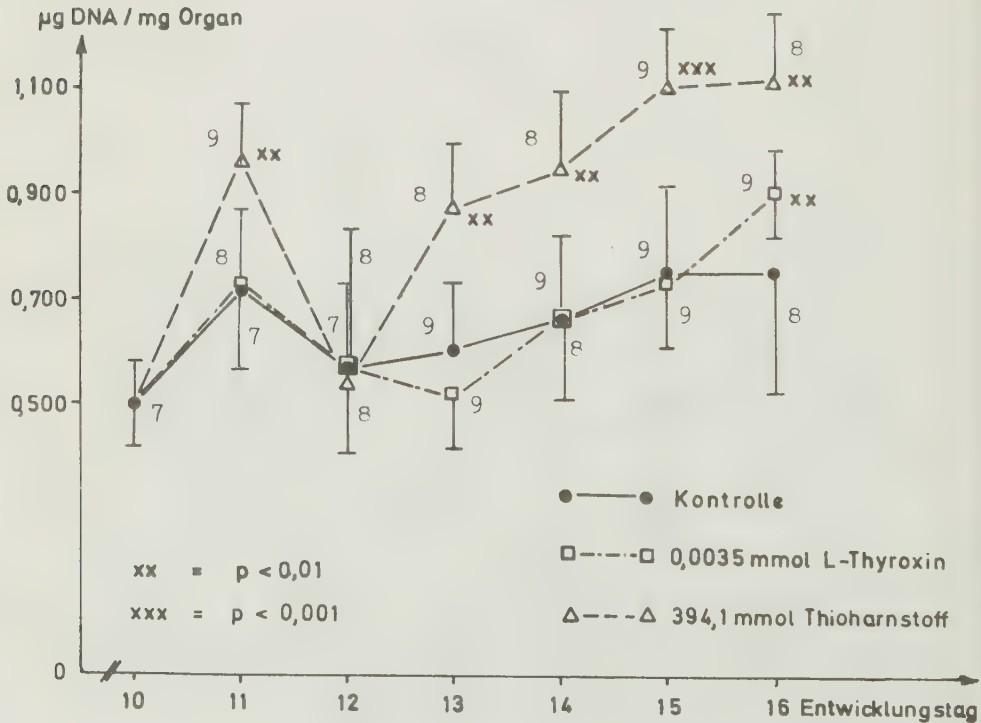
Abb. 9: DNA-Synthese der Niere unter dem Einfluß von Thioharnstoff



entgegengesetzten Effekt zu rechnen war. Im Folgenden wurden daher die Versuche wiederholt, wobei im Fall von L-Thyroxin eine höhere Konzentration (0,028 mmol) und im Fall von Thioharnstoff eine niedrigere Konzentration (32,8 mmol) appliziert wurde.

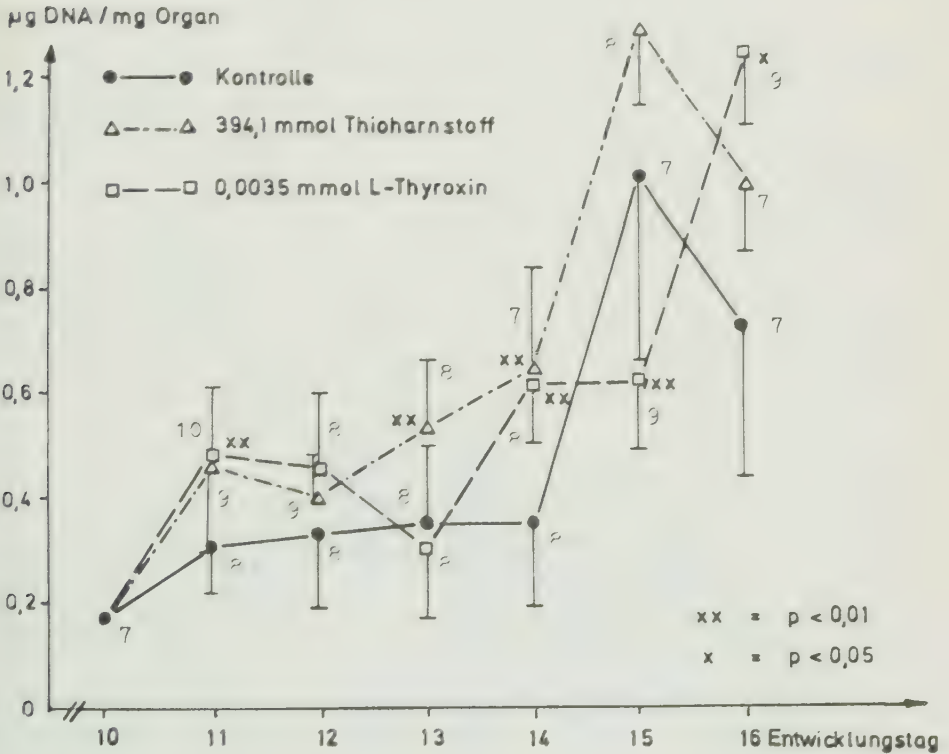
Wie Abb.4 zeigt, verhinderte eine Applikation von 2,8 nmol L-Thyroxin am 10. Tag die Abnahme des Thymidin-

Abb.10: DNA-Gehalt der Leber unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff



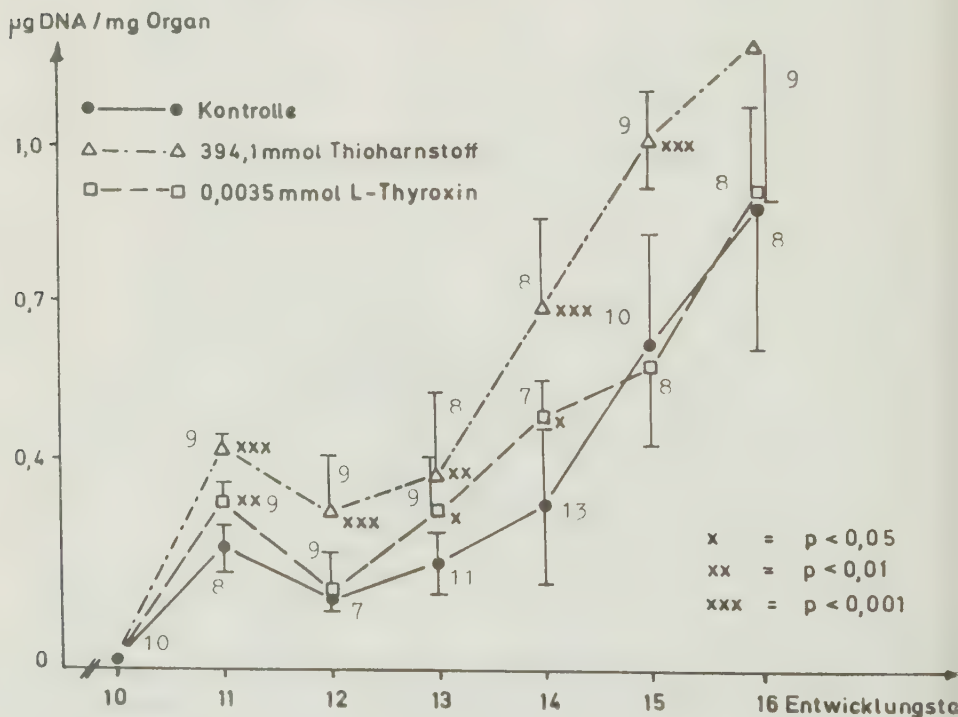
Einbaus der Leber am darauf folgenden Tag, allerdings setzte dann, vom 11. - 12. Tag eine sehr ausgeprägte Abnahme des Thymidin-Einbaus ein, die sich bis zum 14. Tag in einem wesentlich geringeren Ausmaß fortsetzte. Untersuchungen über den 14. Tag hinaus waren nicht mög-

Abb.11: DNA-Gehalt der Lunge unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff



lich, da die Embryonen am 14. Tag starben. In der Lunge (Abb. 6) verursachte diese Menge an L-Thyroxin vom 10. zum 11. Tag keine gesteigerte Abnahme im Thymidin-Einbau. In den folgenden Tagen war dann, ähnlich wie bei den Embryonen, die mit 0,35 nmol L-Thyroxin behandelt worden waren, der Thymidin-Einbau deutlich geringer als bei der Kontrolle. In der Niere (Abb. 8) löste die erhöhte Menge L-Thyroxin eine deutliche Abnahme des Thymidin-Einbaus im Vergleich zur Kontrolle

Abb.12: DNA-Gehalt der Niere unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff

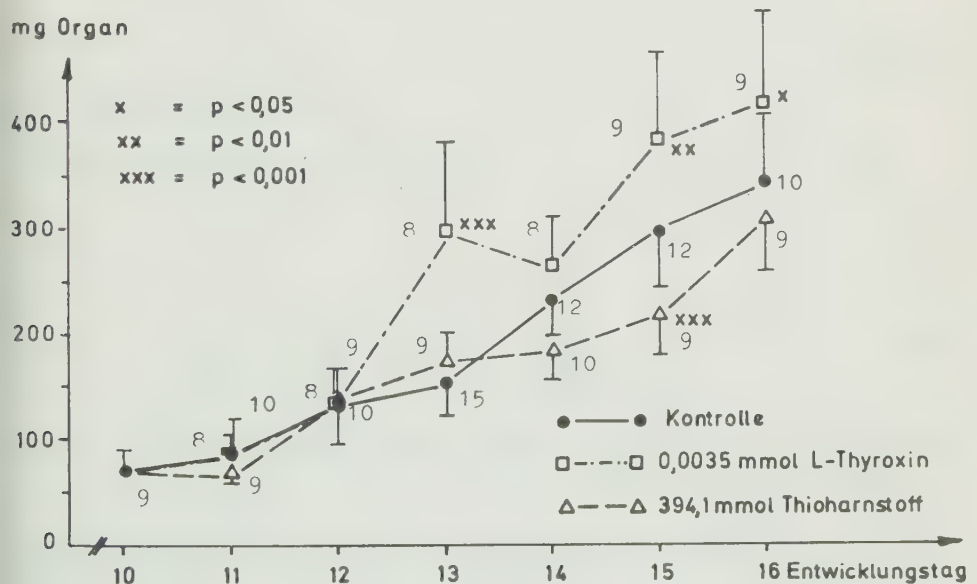


aus. Sie war im allgemeinen stärker ausgeprägt als bei einer Menge von 0,35 nmol. Lediglich am 11. Tag lagen die Werte der höheren Konzentration über denen der niedrigen. Wurden an Stelle von 39,41 μ mol Thioharnstoff nur 3,28 μ mol eingesetzt, so waren die Einbauraten der Leber (Abb. 5) und der Lunge (Abb. 7) nur am 13. und 14. Tag niedriger als bei der Kontrolle. In der Niere (Abb. 9) war der Verlauf ähnlich dem der Kontrolltiere.

4.2.2.2. Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den DNA-Gehalt der Organe

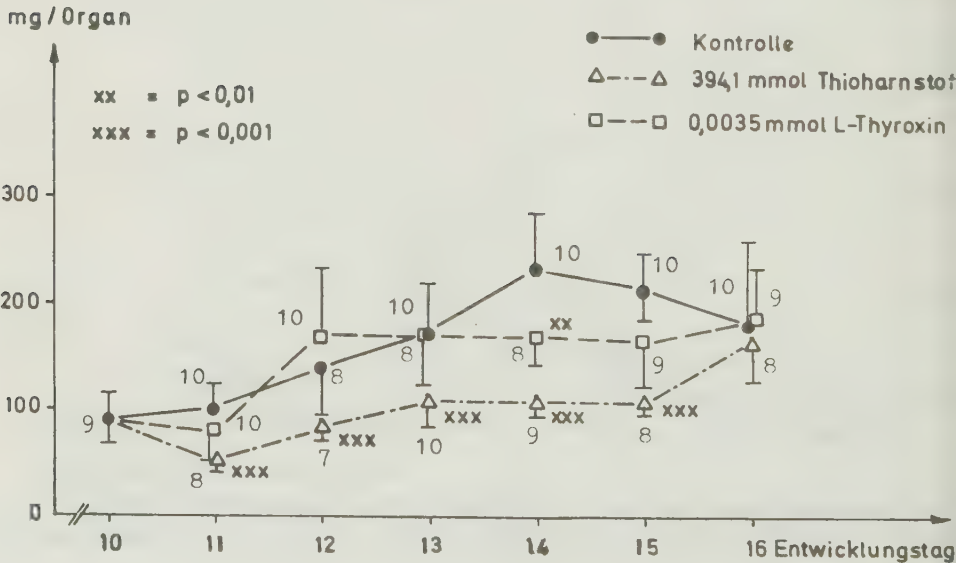
Im Folgenden interessierte, inwieweit eine Applika-

Abb.13: Gewicht der Leber unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff



tion von L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff Auswirkungen auf den DNA-Gesamt-Gehalt der betroffenen Organe zur Folge hatte. Wie Abb.10 zeigt, steigt in der Leber vom 12. zum 16. Tag der DNA-Gehalt pro mg Organ geringgradig an. Die Lunge (Abb.11) ist durch einen steilen Anstieg vom 14. zum 15. Tag charakterisiert und in der Niere (Abb.12) steigt der DNA-Gehalt ebenfalls kontinuierlich an. Wurden die Embryonen mit Thioharnstoff behandelt, so erhöhte sich - von einigen Tagen abgesehen - der DNA-Gehalt in allen 3 Organen.

Abb.14: Gewicht der Lunge unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff

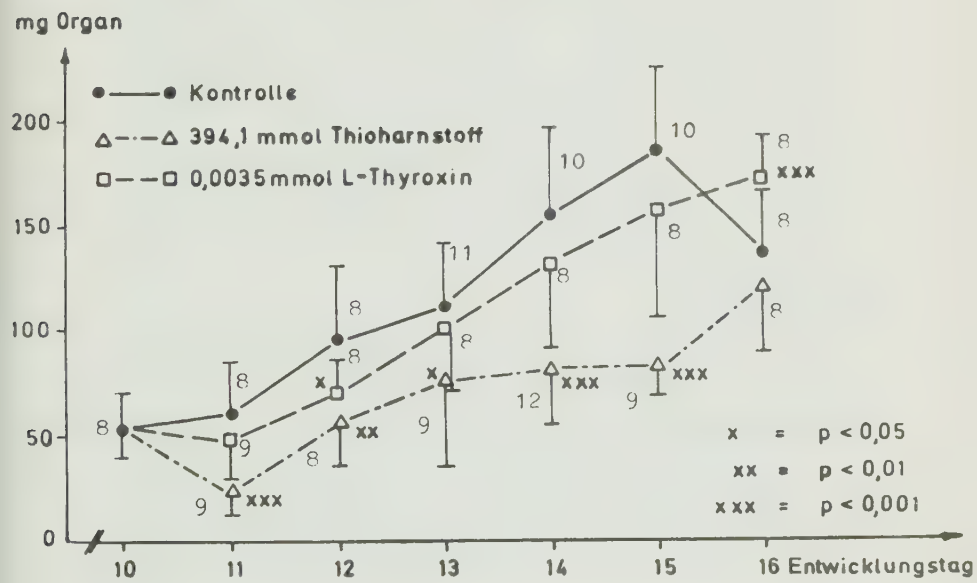


Demgegenüber hatte L-Thyroxin in allen 3 Organen nur an einigen wenigen Tagen Zunahmen des DNA-Gehaltes zur Folge. In der Regel fielen diese dann auch im Vergleich zu denen, die durch Thioharnstoff ausgelöst wurden, wesentlich geringer aus.

4.2.2.3. Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf das Gewicht der Organe

Bei den unbehandelten Embryonen nimmt das Organgewicht, wie aus den Abb.13, 14 und 15 zu entnehmen ist, vom 10. -

Abb.15: Gewicht der Niere unter dem Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff



16. Tag nur geringfügig zu. Am deutlichsten sind dabei die Zunahmen der Leber (Abb.13) und der Niere (Abb.15). Eine Behandlung mit Thioharnstoff führte zu einer deutlich verringerten Wachstumsrate der Lunge (Abb.14) und der Niere. Bei der Leber war die Gewichtszunahme nur am 15. Tag geringer als bei der Kontrolle. L-Thyroxin dagegen führte bei der Leber zu einer Gewichtszunahme vom 13. - 16. Tag. Bei der Niere waren die Organgewichte in der Regel niedriger als die der Kontrolle. Dieser Unterschied ließ sich jedoch statistisch nicht sichern. Bei der Lunge schließlich war nur am 14. Tag eine statistisch gesicherte Wachstumsdepression zu beobachten.

4.2.2.4. Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den

L-Thyroxin-Blutspiegel

In einem abschließenden Versuch wurde dann untersucht, inwieweit eine Applikation von L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff am 10. Tag der Inkubation den Plasmagehalt an L-Thyroxin beeinflussen kann. Die Untersuchungen (Tabelle V) ergaben, daß Thioharnstoff einen deutlichen Abfall des L-Thyroxin-Blutspiegels auslöst, während eine Applikation von L-Thyroxin den für die Kontrolle ermittelten Blutspiegel nicht nachhaltig veränderte.

Tabelle V

Beeinflussung des L-Thyroxin-Blutspiegels durch L-Thyroxin und Thioharnstoff. Angaben in $\mu\text{g/dl}$ (n=8)

Entwicklungstag	Kontrolle	L-Thyroxin	Thioharnstoff
11	0,5	0,6	0,35
13	0,9	0,95	0,6
15	1,15	1,2	0,8

5.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf das Schlupfgeschehen untersucht, wobei die Substanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung verabreicht wurden, nämlich gegen Ende der Embryogenese (17. Tag) und dann am 10. Tag der Inkubation.

Die Befunde, die bei der Verabreichung am 17. Tag erhalten wurden, bestätigen die Ergebnisse anderer Autoren. Unter dem Einfluß von L-Thyroxin kommt es zu einem vorzeitigen Schlupf (BEYER 1962, OPPENHEIM 1973, SCHMIDT 1986, WEIS 1979, WITTMANN et al. 1984), während Thioharnstoff den Schlupf verzögert (BALABAN und HILL 1971, GROSSOWICZ 1946, SCHMIDT 1986, WEIS 1979, WITTMANN et al. 1984). Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, ist der molekular-biologische Zusammenhang, über den in das Schlupfgeschehen eingegriffen wird, bis jetzt noch nicht geklärt. Man kann jedoch davon ausgehen, daß unter dem Einfluß von L-Thyroxin die Entwicklung beschleunigt wird. Als Folge davon kommt es zu einer vorzeitigen Auslösung der prä-natalen Atmung, die als entscheidender Stimulus für die Auslösung des Schlupfes anzusehen ist (OPPENHEIM 1973, WITTMANN et al. 1984). Im Fall von Thioharnstoff stellte sich die gegenteilige Wirkung ein (WITTMANN et al. 1984).

Um einen Hinweis zu erhalten, ob die Substanzen ihre Wirkung auf der Ebene des Nukleinsäurestoffwechsels, von dem die entscheidenden Impulse für die Entwicklungsprozesse ausgehen, entfalten, wurde die DNA-Synthese anhand des Thymidin-Einbaus verfolgt. Dabei wur-

den die Befunde aus Untersuchungen an der Kaulquappe zugrunde gelegt, wonach dort die Beschleunigung der Metamorphose durch L-Thyroxin sich in einem beschleunigten Thymidin-Einbau in die DNA äußert (SMITH-GILL und CARVER 1981).

Bei den Versuchen dieser Arbeit zeigte sich aber, daß L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff in der Leber und der Niere genau den entgegengesetzt zu erwartenden Effekt auslösten: L-Thyroxin verringerte die Thymidin-Einbaurrate, während Thioharnstoff sie im Vergleich zur Kontrolle erhöhte (Abb.1 u. 3). Nun fällt bei den Werten in Abb.1 - 3 auf, daß auch bei den Kontrollen die Einbaurrate vom 17. zum 20. Tag permanent abnimmt. Die beschleunigende Wirkung des L-Thyroxin auf den Schlupf kommt demnach dadurch zustande, daß das Schilddrüsenhormon den natürlich vorgegebenen Abfall des Thymidin-Einbaus beschleunigt und Thioharnstoff ihn verzögert. Dies gilt auch für andere Parameter; so beschleunigte L-Thyroxin den Abfall von Glykogen und ATP in der Leber, während Thioharnstoff ihn verzögerte (WEIß 1979).

Dieses Konzept gilt offensichtlich nur zum Teil in der Lunge. Ähnlich wie in den anderen Organen führte auch hier die Behandlung mit L-Thyroxin zu einem vorzeitigen Abfall der Einbau-Kurve, aber auch Thioharnstoff löste qualitativ einen derartigen Effekt aus (Abb.2). Allem Anschein nach stimuliert L-Thyroxin auch in der Lunge den Entwicklungs- und Differenzierungsprozeß. Darauf weisen auch die morphologischen Studien, die unter den selben Bedingungen von STEIB (1987) durchgeführt wurden, hin. Sie konnte zeigen, daß unter dem Einfluß von L-Thyroxin die Differen-

zierung der Pneumozyten II, die an der Surfactand-Bildung beteiligt sind, und die Ausbildung der Lungengefäße und Luftkapillaren sich vorzeitig vollzieht. Gleichzeitig wurde nach Gaben von L-Thyroxin die Resorption der Lungenflüssigkeit beschleunigt. Demgegenüber war unter dem Einfluß von Thioharnstoff die Ausbildung dieser Parameter verzögert. Es scheint daher unwahrscheinlich, daß in der Lunge der vorzeitige Abfall des Thymidin-Einbaus (Abb.2), den Thioharnstoff verursachte, in seiner Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung mit dem Abfall, den L-Thyroxin auslöste, gleichzusetzen ist.

Vergleicht man nun die Wirkung, die L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff nach Applikation am 10. Tag auslöste, so unterdrückte Thioharnstoff in diesem Fall den Schlupf, während sich unter dem Einfluß von L-Thyroxin kein vorzeitiger Schlupf mehr einstellte. Diese Befunde stimmen mit denen von NAUMANN (1987) überein. Eine zu geringe L-Thyroxin Konzentration dürfte nicht die Ursache dafür gewesen sein, daß sich kein Effekt auf den Schlupf einstellte. Eine Steigerung der Dosis führte nämlich zu einem Absterben der Embryonen. Auf der anderen Seite kann der Befund, daß exogenes L-Thyroxin den T_4 -Plasmaspiegel nicht signifikant erhöhte, noch nicht als Beweis dafür angesehen werden, daß das verabreichte Schilddrüsenhormon den Embryo nicht erreichte, da bekannt ist, daß T_4 zu diesem Zeitpunkt zu T_3 umgesetzt wird und T_3 nach KLANDORF et al. (1981) als das eigentlich wirksam Schilddrüsenhormon anzusehen ist. Außerdem zeigen vor allem die Werte über den Thymidin-Einbau, daß das exogen verabreichte L-Thyroxin metabolisch wirksam war (Abb.1 bis 4, 6 und 8).

Schließlich überrascht, daß der Thymidin-Einbau sich bei beiden Substanzen in der Leber, Lunge und Niere signifikant verringerte (Abb. 4 - 9). Aus dem Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis (Tab. IV) ergeben sich keine Hinweise, daß unter dem Einfluß von L-Thyroxin die Eivorräte zugunsten des Wachstums rascher umgesetzt wurden. Ganz im Gegenteil, das nach Gaben von L-Thyroxin zwar nicht immer signifikante, aber durchwegs erhöhte Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis spricht eher für eine verringerte Umsetzung bzw. ein verringertes Wachstum. Auf der anderen Seite ergibt das Ei/Embryo-Gewichtsverhältnis der mit Thioharnstoff behandelten Embryonen auch keinen Hinweis dafür, daß durch das Thyreostatikum in das Wachstum eingegriffen wurde. Es fällt aber auf, daß das Lungen- und Nierengewicht (Abb.14 und 15) und zum Teil auch das Gewicht der Leber (Abb.13) von Thioharnstoff-behandelten Embryonen deutlich verringert ist. Dieser Befund würde für ein verzögertes Wachstum dieser Organe unter dem Einfluß von Thioharnstoff sprechen.

Hingegen wich das Gewicht der genannten Organe unter dem Einfluß von L-Thyroxin nur zum Teil von dem der Kontrollen ab. Eine erhöhte Wachstumsrate war nur in der Leber (Abb.13) auszumachen, und auch hier nur in der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraumes. Im Fall der Niere (Abb.15) lagen die Werte der L-Thyroxin-behandelten Embryonen überwiegend unter denen der Kontrolle; die Unterschiede ließen sich aber statistisch nicht sichern. In der Lunge (Abb.14) schließlich verlief die Wachstumskurve der L-Thyroxin-behandelten Embryonen weitgehend gleich mit der Kontrolle. Insgesamt ergeben sich keine Hinweise, daß

unter dem Einfluß von L-Thyroxin nachhaltig in das Wachstum der untersuchten Organe eingegriffen wurde. Übereinstimmend damit konnte bei L-Thyroxin, ähnlich wie bei NAUMANN (1987), auch kein deutlicher Effekt auf den Schlupfzeitpunkt beobachtet werden.

Dennoch machen die Werte in Abb.4, 6 und 8 eine ausgeprägte Einwirkung von L-Thyroxin auf die Thymidin-Einbaureate deutlich: In allen 3 Organen verringerte sich der Thymidin-Einbau nach Applikation von 0,35 nmol L-Thyroxin und bei erhöhtem Einsatz (2,6 nmol) fiel der Effekt noch deutlicher aus. In der Leber und der Lunge beschleunigt L-Thyroxin offensichtlich, ähnlich wie bei der Behandlung am 17. Tag, den vorgegebenen Abfall des Thymidin-Einbaus. Im Gegensatz zu den Untersuchungen in der Endphase löste L-Thyroxin aber bei einer Behandlung am 10. Tag keine schnellere Entwicklung im Ei aus. Es ist daher auch fraglich, ob sich in dem vorzeitigen Abfall der Thymidin-Einbaureate eine entwicklungsbeschleunigende Wirkung des L-Thyroxin widerspiegelt.

Auffallend ist, daß der DNA-Gehalt der Leber (Abb.10) und der Niere (Abb.12) von behandelten und unbehandelten Embryonen sich nicht merklich voneinander unterscheidet, obgleich sich die DNA-Synthese aufgrund der Werte in Abb.4 und 8 verringert hat. In der Lunge schließlich (Abb.6) steht dem deutlichen Abfall in der DNA-Synthese sogar eine Zunahme im DNA-Gehalt gegenüber (Abb.11). Dies legt den Schluß nahe, daß unter den herrschenden Bedingungen der DNA-Abbau sich verlangsamt hat.

Betrachtet man auf der anderen Seite die Auswirkungen von Thioharnstoff, so fällt auf, daß bei einer Menge von 39,41 μmol , die den Schlupf unterdrückte, sich die Thymidin-Einbaurate deutlich reduzierte (Abb.5, 7 und 9). Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den Versuchen in der Endphase der Inkubation. Dort ging die Verzögerung im Schlupf mit einem verlangsamten Abfall des Thymidin-Einbaus in Leber (Abb.1) und Niere (Abb.3) einher.

Ähnlich wie bei L-Thyroxin führte auch bei Thioharnstoff der Abfall in der DNA-Synthese nicht zu einem Abfall der DNA-Konzentration; im Gegenteil, bei den Thioharnstoff-behandelten Embryonen lag der DNA-Gehalt pro mg Organ durchwegs höher als bei den Kontrollen. Offensichtlich ist unter dem Einfluß von Thioharnstoff der DNA-Abbau noch stärker gehemmt, als unter dem Einfluß von L-Thyroxin.

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß in dieser Entwicklungsphase die Zelle bei einer verminderten DNA-Synthese dem Abfall im DNA-Gehalt mit einem verminderten DNA-Abbau entgegenwirkt. Bei Behandlung mit 0,35 nmol L-Thyroxin gelingt es der Zelle, auf diese Weise einen drohenden DNA-Abfall zu verhindern. In diesem unveränderten DNA-Status ist möglicherweise auch die Ursache dafür zu suchen, daß L-Thyroxin trotz der abnehmenden DNA-Synthese keine Auswirkungen auf den Schlupf zur Folge hatte.

Im Fall von Thioharnstoff ist der DNA-Abbau offensichtlich in einem solchen Umfang verringert, daß es trotz eingedämmter DNA-Synthese zu einem Anstieg der DNA-Kon-

zentration pro mg Organ kommt. In diesem Zusammenhang sei vermerkt, daß beim Hühnerembryo dem Anstieg des nuklearen Gesamt-DNA-Gehaltes bis zum 14. Tag ein Abfall gegen den Schlupf zu folgt (CALDARERA und MORUZZI 1965). Der schlupffähige, ausgereifte Embryo ist demnach durch einen niedrigen nuklearen DNA-Gehalt charakterisiert. Es ist anzunehmen, daß diesen DNA-Status der Schlupfreife Embryonen, bei denen Thioharnstoff eine Erhöhung des DNA-Gehaltes auslöste, erst zu einem späteren Zeitpunkt erreichen und daher auch ihren Schlupf entsprechend verzögert einleiten.

Schließlich stellt sich die Frage, warum sich nach Verabreichung von Thioharnstoff am 17. wie auch am 10. Tag eine Verzögerung der Entwicklung einstellte, obgleich im ersten Fall Thioharnstoff den Abfall der DNA-Synthese verzögerte (Abb.1 und 3) und im zweiten Fall (Abb.5, 7 und 9) beschleunigte. Eine definitive Klärung dieses Befundes ist auf Grund der Versuche nicht möglich. Es ist jedoch naheliegend, daß in diesem Verhalten der Entwicklungsstatus der betreffenden Organe eine Rolle spielt. Darauf weisen auch die Werte der Lunge hin, in der eine Applikation von Thioharnstoff auch noch am 17. Tag, im Gegensatz zur Leber und Niere, einen beschleunigten Abfall der DNA-Synthese (Abb.2) auslöste. Dieses Organ ist zu diesem Zeitpunkt in morphologischer sowie funktioneller Hinsicht noch weitgehend undifferenziert (STEIB 1987).

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf die DNA-Synthese der Leber, Lunge und Niere beim Hühnerembryo untersucht. Dabei wurden die Substanzen am 17. bzw. 10. Tag der Inkubation appliziert.

Bei einer Verabreichung am 17. Tag löste L-Thyroxin (0,084 mmol) einen um 1 Tag verfrühten und Thioharnstoff (131,37 mmol) einen um 1 Tag verspäteten Schlupf aus.

Gleichzeitig verringerte sich in der Leber und der Niere nach Applikation von L-Thyroxin der Thymidin-Einbau in die Kern-DNA. Thioharnstoff dagegen zeigte eine Verzögerung im Abfall der Thymidin-Einbauraten beider Organe. In der Lunge verursachten beide Substanzen einen Abfall im Thymidin-Einbau.

Durch eine Applikation von 394,1 mmol Thioharnstoff am 10. Tag wurde der Schlupf unterdrückt. L-Thyroxin (0,0035 mmol) zeigte keinen Effekt auf den Schlupfzeitpunkt; eine Steigerung der Dosis (0,028 mmol) bewirkte ein Absterben der Embryonen.

Beide Substanzen führten in allen 3 Organen zu einer deutlich verringerten Einbauraten des Thymidins. Unter dem Einfluß von Thioharnstoff erhöhte sich allerdings der nukleare DNA-Gehalt der Organe. Auf der anderen Seite war die Wachstumsrate der Organe verringert. L-Thyroxin zeigte auf diese Parameter keine deutlichen Effekte.

Insgesamt zeigen die Versuche, daß die Verabreichung von L-Thyroxin und Thioharnstoff deutliche Auswirkungen auf den DNA-Stoffwechsel zur Folge hat. Dabei ist die Entfaltung dieser Wirkung deutlich vom Entwicklungsstatus des Embryos abhängig.

Summary

The influence of L-thyroxine and thiourea on the DNA-synthesis of the chick embryo

In the studies presented here, the influence of L-thyroxine and thiourea on the DNA-synthesis of liver, lung and kidney of the chick embryo was investigated. The substances were applied at day 10 and 17 of incubation.

Applied at the 17 th day of incubation L-thyroxine (0,084 mmol) produced a one day earlier and thiourea (131,37 mmol) a one day later release of hatching.

Simultaneously, the thymidine uptake into the nucleic DNA of liver and kidney was decreased after the application of L-thyroxine. On the other hand thiourea released a decrease in the thymidine uptake of both organs. In the lung both substances produced a decrease of the thymidine uptake.

The application of 394,1 mmol thiourea at the 10 th day of incubation suppressed the hatching of the embryos. Treating with L-thyroxine (0,0035 mmol) exerted no influence on hatching; a raising of the dose (0,028 mmol) resulted in fading of the embryos.

Both substances produced a significant decrease of thymidine uptake in all 3 organs. Nevertheless, under the influence of thiourea the nucleic DNA amount of the organs was increased. On the other hand the increase in weight of the organs was reduced. L-thyroxine showed no distinct effect.

Altogether the experiments showed, that the application of L-thyroxine and thiourea has a distinct effect on the DNA metabolism. The developing of these effects is distinctly dependent on the developmental stage of the embryos.

7. Literaturverzeichnis

1. BALABAN M. und HILL J., 1971
Effects of thyroxine level and temperature manipulations upon the hatching of chick embryo.
Developm. Psychobiol. 4 (1), 17 - 35
2. BEYER R.E., 1952
The effect of thyroxine upon the general metabolism of the intact chickembryo
Endocr. 50, 497 - 502
3. BOSE A., 1965
A study on the ontogeny of kidney in chick
Experientia 21, 330
4. BOYDEN E.A., 1924
An experimental study of the development of the avia cloaca with special reference to a mechanical factor in the growth of the allantois
J. Exptl. Zool. 61, 437 - 472
5. BRADWAY W., 1929
The morphogenesis of the thyroid follicels of the chick
Anat. Rec. XLII, 157 - 163

6. BRANDSTETTER W.A., WATTERSON R.L. and VENEZIANO P., 1962
Modified growth pattern of the musculus complexus (hatching muscle) of chick embryos following thiourea treatment or hypophysectomy by partial decapitation
Anat. Rec. 142, 299
7. BURTON K., 1956
Studies of the conditions and mechanisms of the colorimetric estimation of the desoxyribonucleic acid
Biochem. J. 62, 315 - 323
8. CALDARERA C.M. und MORUZZI G., 1965
Polyamines and nucleic acids during development of the chick embryo
Biochem. J. 97, 84
9. CHAMBERS R. und KEMPTON R.T., 1933
Indication of function of the chick mesonephros in tissue culture with phenol red
J. of Cell. Comp. Phys. 3, 131 - 167
10. CLARK H. und FISHER D., 1957
A reconsideration of nitrogen excretion by the chick embryo
J. exp. Zool. 136, 1 - 15

11. CODY V., 1980
Thyroid hormone interactions: molecular confirmation,
protein binding and hormone action
Endocr. Rev. 1 (2), 140 - 166
12. DALTON A.J., 1937 b
The functional differentiation of the hepatic
cells of the chick embryo
Anat. Rec. 68, 393 - 403
13. DECUYPERE E., KÜHN E.R., CLIJMANS B., NOUWEN E.J.
and MICHELS H., 1980
Direct evidence for prenatal monodejodation in
the chick embryo
in: Abstracts; 28 Intern. Congr. f. Physiol.,
Budapest, 373
14. DECUYPERE E., NOUWEN E.J., KÜHN E.R., GEERS R.
and MICHELS H., 1979
Jodohormones in the serum of chick embryos and
post-hatching chicken as influenced by incubation
temperature. Relationship with the hatching pro-
cess and thermogenesis
Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 1979 19 (6),
1713 - 1723

15. DUMM M.E. and LEVY M., 1949
Chemistry of the chick embryo
IV The accumulation of the solids, nitrogen,
lipids and peptidase of the gizzards and liver
of the chick embryo
J. Cell. Comp. Phys. 33, 373 - 382
16. EMANUELSSON H., 1958
Variations in nucleic acid concentration during
the development of early chick embryos
Acta. physiol. scand. 1958, 44, 336 - 364
17. FALCONER I.R., 1971
Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl,
Freeman and Bell (eds.)
Academic Press London, 469 - 471
18. FARER L.S., ROBBINS J., BLUMBERG B.S. and RALL J.E.,
1962
Thyroxine-serum protein complexes in various
animals
Endocrinology 70, 686
19. FEDDE M.R., 1976
Respiration in Avian Physiology 3 rd ed.
(P.D. Sturkie, Ed.) New York
Springer Verlag p. 122

20. FISHER J.R., CURTIS J.L. and WOOPWARD W.D.,
1967
Developmental changes and control of xanthine
dehydrogenases in developing chicks
Developmental Biology 15, 289 - 299
21. FISHER D.A., HOATH S. and LAKSHMANAN J., 1982
The thyroid hormone effects on growth and de-
velopment may be mediated by growth factors
Endocrin. Experimentalis 16, 259 - 260
22. FREEMAN B.M., 1964 a
Studies on the oxygen requirements and hatching
mechanisms of the domestic fowl
Ph. D. thesis, University of Leicester
23. FREEMAN B.M. and VINCE M.A., 1974
Development of the avian embryo
Chapman and Hall (eds.), London
24. GELESO J.P., HUNAN P., LEGRAND J., LEGRAND C. and
JOST A., 1968
Laine aspects of thyroid physiology during the
perinatal period
Gen. Comps. Endocrin. 10, 191 - 197

25. GREENBERG A.H., GRENCHOW P., REBA R.C., TYSON J.
and BLIZZARD R.M., 1970
Observations on the maturation of thyroid
function in early fetal life
J. Clin. Invest. 49, 1790 - 1803
26. GROSSOWICZ W., 1946
Influence of thiourea on development of the chick
embryo
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 63, 151 - 152
27. GRÜNWARD P., 1937
Zur Entwicklungsmechanik des Urogenitalsystems
beim Huhn
Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 136, 786 - 813
28. HANAN E.B., 1927
Absorption of vital dyes by the fetal membranes
of the chick
An. J. of Anat. 38, 423 - 450
29. HANES F.M., 1912
Lipid metabolism in the developing chick and it's
relation to calcification
J. Exptl. Med. 16, 512 - 526

30. HANSBOROUGH L.A. and KHAN M., 1951
The initial function of chick thyroid gland with
the use of radiojodine
J.exp. Zool. 116, 195
31. HENNINGER R.W. and NEWCOMER W.S., 1964
Plasma protein binding, half-life, uptake of
thyroxine and triiodothyronine in chickens
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 624
32. KAICK V.G. und GRÖTTLER K., 1968
Technik und Probleme teratologischer Studien
am bebrüteten Keim
Kurze wiss. Mitt. 17
33. KIRKMAN F.B., 1931
The birth of a blackhead gull
Br. Birds 24, 283 - 291
34. KLANDORF H., SHARP P.J. and NEWCOMER W.S., 1981
The influence of feeding patterns on daily
variation in the concentrations of plasma
thyroid hormones in the hen
IRCS Med. Sci. 9, 82

35. KUO Z.Y., 1932 a
Ontogeny of embryonic behaviour in aves
I The chronology and general mature of behaviour
of the chick embryo
J. Comp. Psych. 14, 109 - 122
36. KUO Z.Y., 1932 b
Ontogeny of embryonic behaviour in aves
IV The influence of embryonic movements upon the
behaviour after hatching
Expt. Zool. 61, 395 - 430
37. LOCY W.A. and LARSELL C., 1961 a
The embryology of the birds lung based on ob-
servations of the domestic fowl
Part I Am. J. Anat. 19, 447
38. LOCY W.A. and LARSELL C., 1961 b
The embryology of the birds lung based on ob-
servations of the domestic fowl
Part II Am. J. Anat. 19, 447
39. Mc NABB F.M.A., WEIRICH R.T. and Mc NABB R.A., 1981
Thyroid function in embryonic and perinatal
Japanese quail
Gen. Comp. Endocrin. 43, 218

40. MESS B. and STRAZNICKY K., 1970
Dynamics of ribonucleic acid (RNA) synthesis
in thyroid epithelial cells of normal and decapitated chicken embryos
Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 21, 115
41. NAUMANN J., 1987
Der Verlauf des Pteridinmusters beim Hühnerembryo
und dessen Beeinflussung durch Thioharnstoff, L-Thyroxin und Cycloheximid
Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München
42. NEEDHAM J. 1926 b
The energy-sources in ontogenesis
III The ammonia content of the developing avian egg and the theory of recapitulation
J. exp. Biol. 4, 145 - 154
43. NICKEL R., SCHUMMER A. und SEIFERLE E., 1973
in: Anatomie der Hausvögel
Paul Parey, 85 - 86
44. OPPENHEIM R.W., 1973
Prehatching and hatching behaviour. Comparative and physiological consideration. In " Behavioural Embryology " (Gottlieb G., Edt.)
Academic Press, 163 - 244

45. RAHEJA K.L. und LINSCHER W.G., 1979
Lipid and carbohydrate metabolism in euthyroid
and hypothyroid chick embryos
Comp. Biochem. Physiol. 64 B, 289 - 291
46. REFETOFF S., ROBIN N.J. and FANG V.S., 1970
Parameters of thyroid function in serum of 16
selected vertebrate species: Study of PBI, serum
 T_4 , free T_4 and the pattern of T_4 and T_3 binding
to serum proteins
Endocrinology 86, 793
47. ROMANOFF A.L., 1960
" The avian embryo "
Mac Millen Co., New York
48. ROMANOFF A.L. und LAUFER H., 1956
The effects of injected thiourea on the development
of some organs of the chick embryo
J. Physiol. 92, 219 - 227
49. ROMIJN C., 1948
Respiratory movements of the chicken during the
parafoetal period
Physiol. Comp. Oecol. 1, 24 - 28

50. ROMIJN C., FUNG K.F. and LOKHORST W., 1952
Thyroxine, thiouracil and embryonic respiration
in white leghorns
Poult. Sci. 31, 648 - 691
51. ROMIJN C. and ROSS J., 1938
The air space of the hen's egg and it's changes
during the period of incubation
J. Physiol. Lond. 94, 365 - 379
52. SACHS L., 1947
Angewandte Statistik (U-Test WILCOXON, MAN and
WHITNEY)
Springer Verlag, 230 - 238
53. SCHMIDT P., 1986
Über die Funktion des aviären Kallikrein-Kinin-
und Angiotensin-Renin-Systems bei der Auslösung
der Lungenatmung des Huhnes
Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München
54. SHELLABARGER C.J., 1955
A comparison of trijodthyronine and thyroxine in
the chick goiter-prevention
Poult. Sci. 34, 1437

55. SHEPARD T.H., 1967
Onset of function of the human fetal thyroid
J. Clin. Endocrin. Metab. 27, 945 - 958
56. SMILEY J.D. and ZIFF M., 1964
Urinary hydroxyproline and growth
Physiol. Rev. 44, 30 - 44
57. SMITH-GILL S.J. and CARVER V., 1981
Biochemical characterisation of organ differentiation
and maturation
Metamorphosis, 2 nd Edition
Ed. Gilbert L.J. and Frieden E., Plenum Press,
New York and London
58. STEIB A., 1987
Experimentell-morphologische Untersuchungen zur
Entwicklung der Parabronchen in der embryonalen
Hühnerlunge
Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München
59. STOLL R. and BLANQUET P., 1953
Sur l'activite des thyroïdes de l'embryon
du poulet, provenant d'oeufs " marques " par
l'administration de ¹³¹ J a la poule
Ann. Endocrin. (Paris) 14, 1

60. SUN T.P., 1932
Histo-physiogenesis of the glands of internal
secretion - thyroid, adrenal, parathyroid and
thymus - of the chick embryo
Phys. Zool. 5(3), 348 - 395
61. TATA J.R. and SHELLABARGER C.J., 1959
An explanation for the difference between the
response of mammals and birds to thyroxine and
triiodothyronine
Biochem. J. 72, 608
62. THOMMES R.C. and HYJKA V.W., 1978
Hypothalamo-adenohypophyseal-thyroid interrelation-
ships in the chick embryo
Gen. Corp. Endocr. 34, 193 - 200
63. THOMMES R.C. and JAMESON K.M., 1980
Hypothalamo-adenohypophyseal-thyroid interrelation-
ships in the chick embryo
Gen. Corp. Endocr. 42, 267 - 269
64. THOMMES R.C. and PALL J.S., 1974
Effects of hypophysectomy by surgical decapitation
on histochemically demonstrable peroxidase activity
in the thyroid gland of the developing chick embryo
Gen. Corp. Endocr. 23, 52 - 57

65. THOMMES R.C. and TONETTA S.A., 1979
Hypothalamo-adenohypophyseal-thyroid interrelationships in the chicken embryo
Gen. Corp. Endocr. 37, 167 - 176
66. THOMMES R.C., VIETH R.L. and LEVASSER S., 1977
The effect of hypophysectomy by means of surgical decapitation on the thyroid function in the developing chick embryo
Gen. a. Comp. Endocr. 31, 29 - 36
67. WEIß A., 1979
Der Einfluß des Thyroxins und Thioharnstoffs auf biochemische Vorgänge in der perinatalen Phase
Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München
68. WENTWORTH B.C. and RINGER R.K., 1976
Thyroids in " Avian Physiology " 3 rd ed.
(P.D. Sturkie, Ed.)
New York, Springer Verlag p. 122
69. WIDNELL C.C. and TATA J.R., 1964
A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver nuclei
Biochem. J. 92, 313 - 317

70. WITTMANN J., KUGLER W. und KOLB H., 1984
Influence of L-thyroxine and thiourea on metabolism
and lung respiration in embryonic chicks
Seymour R.S. (ed.) Respiration and metabolism of
embryonic vertebrates. Dr. W. Junk Publisher,
Dodrecht, Boston and London, 311 - 318

Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager danke ich recht herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann danke ich für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. M. Goldberg danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und die stets gewährte Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Frau U. Seeliger und Frau B. Aman danke ich für die Unterstützung in techn. Fragen.

Lebenslauf

Johann-Peter Bast	8000 München 2 Westendstr. 22
Geburtstag, Geburtsort	21.02.56 Siegen-Eiserfeld, NRW
Familienstand	ledig
Schulen	1962 - 66 Grundschule " Eichertschule " in Eiserfeld 1966 - 75 Gymnasium " Städt. Gymnasium Am Löhrtor " in Siegen
Abitur	24.06.75
Studium	1980 - 85 Fach: Tier- medizin an der Ludwig- Maximilians-Universität, München
Approbation	10.02.86
Dissertation	ab Januar 1986

